

Monoterpenoide Indolalkaloide aus pflanzlichen Zellkulturen

Karl-Heinz Pawelka

*Diss.
München
1985*

MONOTERPENOIDE INDOLALKALOIDE AUS PFLANZLICHEN ZELLKULTUREN

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Karl-Heinz Pawelka
aus Koblenz

Januar 1985

1. Referent : Doz.Dr.J.Stöckigt

2. Referent : Prof.Dr.H.Wagner

Eingereicht am 21.1.1985

Tag der mündlichen Prüfung : 25.2.1985

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I. E I N L E I T U N G	1
II. M A T E R I A L U N D M E T H O D E N	8
1. Pflanzliches Material	8
1.1. Differenzierte Pflanzen	8
1.2. Pflanzliche Zellkulturen	8
1.3. Frisch- und Trockengewichtsbestimmung	10
1.4. Bestimmung der Parameter des Mediums	10
2. Chemikalien	10
3. Geräte	10
4. Synthesen	12
4.1. Synthese von [^3H -Aryl]-Tabersonin und [^3H -Aryl]-Stemmadenin	12
4.2. Synthese von 1,2-Dehydro-14,15-epoxy- aspidospermidin	12
5. Chromatographische Verfahren	13
5.1. Dünnschichtchromatographie	13
5.2. Säulenchromatographie	13
5.2.1. Trennsystem für <u>Ochrosia elliptica</u>	14
5.2.2. Trennsystem für <u>Rhazya stricta</u>	14
5.2.3. Trennsystem für <u>Voacanga africana</u>	14
5.3. Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie	14
5.4. Quantitative Auswertung des Alkaloidgehaltes mit Hilfe der HPLC-Analytik	15
5.5. Flüssig-flüssig Chromatographie	15
6. Spektroskopische Methoden	16
6.1. Massenspektroskopie	16
6.1.1. Chemische Ionisation	16
6.1.2. Direkte chemische Ionisation	17
6.2. GC - MS - Kopplung	17
6.3. Kernresonanz-Spektroskopie	19
7. Alkaloidisolierung aus pflanzlichen Material	21
8. Herstellung zellfreier Proteinrohextrakte aus pflanzlichen Zellsuspensionskulturen	21

9. Proteinbestimmung	22
III. E R G E B N I S S E	23
1. Alkaloide aus <u>Amsonia ciliata</u> Walt.	23
1.1. Beschreibung der Pflanze	23
1.2. Beschreibung der Zellkultur	23
1.3. Aufarbeitung des Gewebes	23
2. Alkaloide aus <u>Tabernanthe iboga</u> Baill.	26
2.1. Beschreibung der Pflanze	26
2.2. Beschreibung der Zellkultur	26
2.3. Aufarbeitung des Gewebes	26
2.3.1. Alkaloidisolierungen und Identifizierung	27
2.4. Untersuchungen zur enzymatischen Umsetzung	
von Conoflorin	28
2.4.1. Synthese von 1,2-Dehydro-14,15-	
epoxyaspidospermidin	29
3. Alkaloide aus <u>Tabernaemontana divaricata</u> R.Br.	
ex Roem. et Schult.	34
3.1. Beschreibung der Pflanze	34
3.2. Beschreibung der Zellkultur	34
3.3. Aufarbeitung des Gewebes	35
3.3.1. Alkaloidisolierungen und Identifizierung	36
3.3.1.1. Zur Stereochemie der	
Iboga-Alkaloide	38
4. Alkaloide aus <u>Ochrosia elliptica</u> Labill.	45
4.1. Beschreibung der Pflanze	45
4.2. Beschreibung der Zellkultur	45
4.3. Aufarbeitung des Gewebes	45
4.3.1. Säulenchromatographie	46
4.3.2. Alkaloidisolierungen und Identifizierung	47
4.3.2.1. HPLC-Trennsystem	48
5. Alkaloide aus <u>Rhazya stricta</u> Decne.	61
5.1. Beschreibung der Pflanze	61
5.2. Beschreibung der Zellkultur	61
5.3. Aufarbeitung des Gewebes	61
5.3.1. Säulenchromatographie	62
5.3.2. Alkaloidisolierungen und Identifizierung	63

	Seite
5.3.3. Anwendung der präparativen HPLC-Methode zur Isolierung der Alkaloide aus <u>R. stricta</u>	69
5.3. Veränderung des Kulturmediums	71
5.5. Kinetische Untersuchungen	71
5.5.1. Wachstumsparameter des Zellmaterials und Alkaloidbildung	71
5.5.2. Parameter des Kulturmediums	72
6. Alkaloide aus <u>Stemmadenia tomentosa Grenman var. palmeri (Rose)</u>	75
6.1. Beschreibung der Pflanze	75
6.2. Beschreibung der Zellkultur	75
6.3. Aufarbeitung des Gewebes	75
6.3.1. Alkaloidisolierungen und Identifizierung	76
6.4. Die Stellung von Stemmadenin in der Biosynthese von monoterpenoiden Indolalkaloiden	81
6.4.1. Nachweis von Stemmadenin	83
6.5. Optimierung der Wachstumsbedingungen	84
6.6. Kinetische Untersuchungen	86
6.6.1. Wachstumsparameter des Zellmaterials und Alkaloidbildung	86
6.6.2. Parameter des Kulturmediums	87
6.7. Veränderung der Medienzusammensetzung	88
7. Alkaloide aus <u>Voacanga africana Stapf.</u>	91
7.1. Beschreibung der Pflanze	91
7.2. Beschreibung der Zellkultur	91
7.3. Erste Alkaloidbestimmung	91
7.3.1. Aufarbeitung des Gewebes	91
7.3.2. Alkaloidisolierungen und Identifizierung	92
7.4. Die dimeren Alkaloide Voafrin A und Voafrin B .	93
7.4.1. Säulenchromatographische Reinigung von Voafrin A und Voafrin B.....	94
7.4.2. Strukturaufklärung	94
7.4.3. Untersuchungen zu einer möglichen arti- fiziellen Bildung von Voafrin A und Voafrin B	105
7.5. Optimierung der Bedingungen für die Alkaloid- produktion	106

	Seite
7.5.1. Anwendung der HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung der Alkaloide aus <u>V. africana</u>	106
7.5.2. Überführung des Gewebes in unterschiedliche Wachstumsmedien	108
7.5.3. Veränderung der Phytohormone im AP-Medium	109
7.5.4. Veränderung der anorganischen Salze im Medium	109
7.6. Erneute Aufarbeitung des <u>V. africana</u> Gewebes und Bestimmung der Nebenalkaloide	111
7.6.1. Aufarbeitung des Gewebes	111
7.6.2. Alkaloidisolierungen und Identifizierung	113
7.6.3. Anwendung der DCCC-Methode zur Trennung polarer Alkaloidfraktionen	127
7.7. Kinetische Untersuchungen	128
7.7.1. Wachstumsparameter des Zellmaterials und Alkaloidbildung	128
7.7.2. Parameter des Kulturmediums	129
8. Untersuchung von Rubiaceae Zellkulturen	132
9. Anhang	133
IV. DISKUSSION	146
V. ZUSAMMENFASSUNG	161
VI. LITERATURVERZEICHNIS	166

Verwendete Abkürzungen

A	Aspidosperma-Typ-Alkaloid
C	Corynanthe-Typ-Alkaloid
CD	Circular-Dichroismus
Ci	Curie ($3,7 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$, $2,22 \times 10^{12} \text{ dpm}$)
CI	Chemische Ionisation
DCI	Desorptionschemische Ionisation
dpm	Zerfallsrate (desintegrations per minute)
EI	Elektronenstoß Ionisation
FG	Frischgewicht
FM	Fließmittel
I	Iboga-Typ-Alkaloid
M ⁺	Molekularpeak
ppm	parts per million
RP	Reversed Phase
S	Strychnos-Typ-Alkaloid

I. E I N L E I T U N G

Heute ist es möglich Kallus- oder Suspensionskulturen aus fast allen vorkommenden Pflanzen zu gewinnen, soweit geeignete Nährmedien und Hormonkombinationen gewählt werden. Jede einzelne Zelle dieser entdifferenzierten Kulturen ist in der Lage einen selbstständigen Stoffwechsel zu führen und sich unbegrenzt durch Teilung zu vermehren, wie man es von den Mikroorganismen her kennt. Diese autonomen Zellen können aber auch durch Induzieren der Organogenese wieder zu intakten Pflanzen regeneriert werden. Dies belegt sehr eindrucksvoll die Totipotenz der Zelle und damit die schon im vorigen Jahrhundert von SCHLEIDEN (1838) und SCHWANN (1839) postulierte Zelltheorie.

Im Nutz- und Zierpflanzenbau hat diese Technik große Bedeutung gewonnen, da hierdurch die Züchtung vereinfacht und wesentlich beschleunigt werden konnte (REUTHER 1981). Es war aber noch zu klären, ob pflanzliche Zellkulturen überhaupt in der Lage sind, Sekundärstoffe zu bilden. Im Normalfall ist in der intakten Pflanze die Bildung von Sekundärstoffen erst dann möglich, wenn morphologische Differenzierungen eingetreten sind. So entstehen Drüsenschuppen oder Drüsenhaare um etherische Öle aufzunehmen oder es werden Substanzen entfernt von ihrem Bildungsort gespeichert, wie das beispielsweise beim Nicotin der Fall ist. Ein Trennen der chemischen Differenzierung von der morphologischen Differenzierung kann bei pflanzlichen Zellkulturen mit Hilfe der Medienzusammensetzung erfolgen. Es konnte bei Morinda citrifolia gezeigt werden, daß es gleichgültig ist, ob man Kulturen von der Wurzel, vom Blatt, vom Stengel oder der Frucht anlegt. Enthält das Medium die richtigen Phytohormone, so bilden die Kulturen Anthrachinone in hohen Konzentrationen, obwohl diese Substanzen ausschließlich in der Wurzel produziert werden (ZENK et al. 1975).

Bis heute wurde schon eine große Anzahl verschiedener Zellkulturen angelegt, aus denen die unterschiedlichsten Verbindungen isoliert werden konnten:

Beispielsweise Diosgenin, eine Vorstufe für die kommerzielle Synthese

von Steroiden, aus Dioscorea deltoidea (KAUL et al. 1969), Gingsenoide aus Panax ginseng (FURUYA et al. 1973), Saponine aus Panax quinquefolium (JHANG et al. 1974), Anthrachinone aus Morinda citrifolia (ZENK et al. 1975) und aus Cassia tora (TABATA et al. 1975 a). Antimikrobiell wirkende Substanzen aus Lithospermum erythrorhizon (TABATA et al. 1975) und Tabernaemontana-Arten (VAN BEEK et al. 1984), Indolalkaloide von den verschiedensten Arbeitsgruppen und etherische Öle aus Matricaria chamomillae (BISSON et al. 1983).

An diesen wenigen Beispielen kann man erkennen, daß kultivierte Zellen in der Lage sind eine Vielzahl wohl bekannter Verbindungen zu synthetisieren. Eine andere, sehr wesentliche Frage ist, ob die Syntheseleistung einer Kultur auch für die industrielle Produktion interessant erscheint.

Insbesondere mit Hilfe von Medienoptimierung, Selektionsverfahren, Zugabe von Biosynthesevorstufen (ZENK et al. 1977), aber auch Antimetaboliten (BERLIN et al. 1982) ist es in den letzten Jahren gelungen Zellkulturen zu erhalten, die Sekundärstoffe in weit höherer Konzentration anreichern als es die differenzierte Pflanze vermag.

So zeigt Morinda citrifolia einen Anthrachinongehalt von 3 g pro Liter Medium (ZENK et al. 1975). Bezogen auf das Trockengewicht bedeutet dies eine neunfache Steigerung im Vergleich mit der differenzierten Pflanze. Die höchste bis jetzt erreichte Konzentration eines Sekundärstoffes konnte in einer Coleus blumei Suspensionskultur erhalten werden (ZENK et al. 1982).

Industriell genutzt werden heute schon Tabakkulturen (MATSUMOTO et al. 1981), deren Gehalt an Ubichinon-10 mit Hilfe selektionierter Einzelzellen von 0,003% in der Ausgangspflanze auf 0,2% in der Zellsuspension erhöht werden konnte (bezogen auf das Trockengewicht). Besonders interessant erscheinen Kulturen von Lithospermum erythrorhizon, die Shikonin produzieren (FUJITA et al. 1981). Shikonin, das man in Japan als Arzneistoff und zum Färben von Textilien verwendet, wird heute bereits von der Mitsui Petroleum Company industriell gewonnen. Ein herkömmliches Produktionsverfahren wäre hier zu teuer, da Lithospermum Pflanzen sehr langsam wachsen.

Zellkulturen sind also in der Lage Naturstoffe zu produzieren, sie

können aber auch chemische Umwandlungsreaktionen durchführen. Unter anderem werden Mono-, Di- und Triterpene, Isochinolin- und Indolalkaloide, setzt man sie dem Kulturmedium zu, reduziert, oxidiert, methyliert und verestert, um nur einige Reaktionen zu nennen (FURUYA 1978, REINHARD et al. 1980). Dabei ist es unerheblich ob die zu metabolisierenden Substanzen von der Pflanze synthetisiert werden oder nicht (SUGA et al. 1982).

Große Bedeutung hat die Synthese von β -Methyldigoxin aus β -Methyldigitoxin durch Zellkulturen von Digitalis lanata (REINHARD et al. 1980, ALFERMANN et al. 1983). Diese Kulturen sind nicht in der Lage die Herzglykoside Digitoxin und Digoxin selbst zu produzieren, sie können jedoch das methylierte Digitoxin stereoselektiv an C-12 zum β -Methyldigoxin hydroxylieren.

Die Bildung von monoterpenoiden Indolalkaloiden in Zellsuspensionskulturen ist bis heute nur bei wenigen Apocynaceae-Gattungen untersucht worden. Wichtigstes Untersuchungsobjekt war zunächst Catharanthus roseus, da in der differenzierten Pflanze die sehr wertvollen Zytostatika Vincristin und Vinblastin gebildet werden. In den kultivierten Zellen sind diese Substanzen aber nicht vorhanden (CAREW 1975). Speziell an diesem gut untersuchten Objekt, aber auch an den außerdem noch bearbeiteten Kulturen von Catharanthus roseus (STÖCKIGT et al. 1980), Rauwolfia serpentina (STÖCKIGT et al. 1981), Amsonia tabernaemontana und Voacanga thouarsii (PETIARD et al. 1982) kann man erkennen, daß zwar Alkaloide gebildet werden, die Art und Menge aber nicht unbedingt mit dem bisher bekannten Alkaloidmuster der differenzierten Pflanze übereinstimmen muß.

Die Apocynaceae besitzen schon seit langem auf Grund ihres Alkaloidgehaltes eine große medizinische Bedeutung. In der intakten Pflanze findet man Piperidin-, Spermidin-, Steroid- und Indolalkaloide. Nach SCHUMANN (1895) und PICHON (1948) werden die Apocynaceae in drei Unterfamilien unterteilt: Plumerioideae, Cerberoideae und Echitoideae. Alkaloide sind in jeder dieser Unterfamilien zu finden, ausschließlich Indolalkaloide aber nur bei den Plumerioideae.

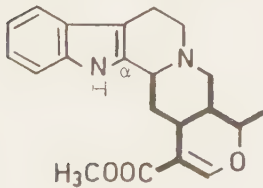
Mit 1800 bekannten Strukturen stellen die Indolalkaloide eine der größten Klasse bei den Alkaloiden dar. Außer bei den Apocynaceae sind sie bei den Rubiaceae und Loganiaceae, aber auch bei einigen

Klasse 1

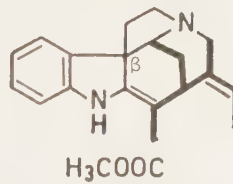
Klasse 1 zeichnet sich dadurch aus, daß das Secologanin in seiner ursprünglichen Form mit dem Tryptamin ein Kondensationsprodukt ergibt. Bezogen auf den Indolteil kann man zwischen einem α - und einem β -Kondensationsprodukt unterscheiden.

Es entstehen zwei unterschiedliche Alkaloid-Typen :

1. **Corynanthe-Typ** repräsentiert z.B. durch das Tetrahydroalstonin
2. **Strychnos-Typ** repräsentiert z.B. durch das Akuammicin, das sich zusätzlich noch durch das Fehlen von C-17 unterscheidet.



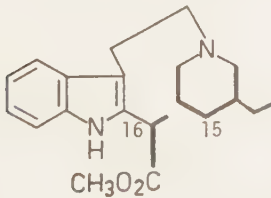
Tetrahydroalstonin



Akuammicin

Abb. 3 : Klasse 1 Alkaloide
Corynanthe- und Strychnos-Typ

In die gleiche Klasse gehört auch noch die Secodin-Gruppe, in der das Secologanin in einer zwischen C-15 und C-16 geöffneten Form vorliegt. **Secodin-Typ** repräsentiert z.B. durch das Tetrahydrosecodin



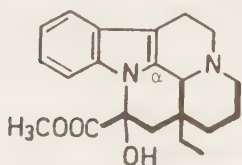
Tetrahydrosecodin

Abb. 4 : Klasse 1 Alkaloid
Secodin-Typ

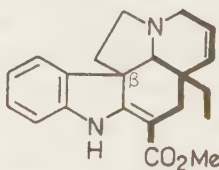
Klasse 2

In Klasse 2 findet man das Secologaningerüst nicht mehr in der ursprünglichen Form vor. Die Bindung zwischen C-15 und C-16 ist wie beim Secodin-Typ geöffnet, es ist aber zwischen C-17 und C-20 eine neue

Bindung geschlossen worden. Auch hier kann man, wie bei Klasse 1, ein α - und ein β -Kondensationsprodukt unterscheiden. Beide Produkte zählt man zum **Aspidosperma-Typ**.



Vincamin



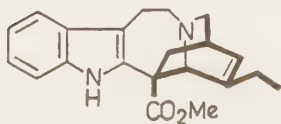
Tabersonin

Abb. 5 : Klasse 2 Alkaloide
Aspidosperma-Typ

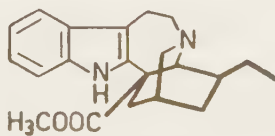
Klasse 3

In Klasse 3 ist ebenfalls die C-15-C-16 Bindung des Secologanins geöffnet. Im Gegensatz zu Klasse 2, bei der eine C-17-C-20 Bindung vorliegt, erfolgte hier die Verknüpfung von C-17 mit C-14.

Hauptvertreter dieses **Iboga-Typs** sind Catharanthin und Coronaridin.



Catharanthin



Coronaridin

Abb. 6 : Klasse 3 Alkaloide
Iboga-Typ

Zu jeder dieser Alkaloidklassen gehört eine eigene Biosynthesesequenz mit den entsprechenden Enzymsystemen. Es hat sich gezeigt, daß gerade die Zellkulturtechnik bei der Erforschung spezifischer Biosyntheseleistungen besonders geeignet ist. So konnte die Biosynthese einiger Verbindungen aufgeklärt werden, unter anderem die der Heteroyohimbin-Alkaloide mit Hilfe einer selektierten Catharanthus roseus Zelllinie (STÖCKIGT 1979, ZENK 1980) und der Rauwolfia-Alkaloide Sarpagin und Ajmalin mit einer Zellsuspensionskultur von Rauwolfia serpentina (PFITZNER 1984).

Am Anfang solcher Arbeiten steht meist die Bestimmung der, von der jeweiligen Kultur gebildeten Alkaloide, denn die Kenntnis des Alkaloidmusters kann erst Aufschluß über eine mögliche Syntheseleistung geben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Alkaloidmuster unterschiedlicher Apocynaceae-Arten aufzuklären und mit der differenzierten Pflanze zu vergleichen. Durch Veränderung der Medien sollte versucht werden die Alkaloidbildung bei interessanten Kulturen zu erhöhen. Ausgehend von den gefundenen Alkaloiden sollten Alkaloidsequenzen gefunden werden, die sich sinnvoll in einen Biosyntheseweg einordnen lassen, um damit den Ausgangspunkt für eine enzymatische Bearbeitung zu finden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Pflanzliches Material

1.1. Differenzierte Pflanzen

Pflanzen von Stemmadenia tomentosa und Voacanga africana wurden im Gewächshaus bei Temperaturen zwischen 20°C und 25°C bei natürlichem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten.

Für die Pflege danke ich Herrn Nagy.

1.2. Pflanzliche Zellkulturen

Die Suspensionskulturen wurden in 1 Literkolben mit je 250 ml Medium oder 300 ml Kolben mit 75 ml Medium auf Rotationsschüttlern (100 Umdrehungen pro Minute) bei 23°C und Dauerlicht (600 Lux) angezogen. Das Animpfen erfolgte je nach Kultur mit 20-50 ml Zellmasse und entsprechend der Wachstumsgeschwindigkeit wurde nach 14-23 Tagen abgeerntet. Nach Entfernen des Kulturmediums durch Abnutschen auf einem Büchnertrichter wurde das Gewebe mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C aufbewahrt.

Kalluskulturen wuchsen in Petrischalen und einem mit 1% Agar verfestigtem Medium. Für das Anlegen der Zellkulturen danke ich Frau Dr. Deus-Neumann und dem Zellkulturlabor des Instituts.

Die unterschiedlichen Wuchsbedingungen für alle Suspensionskulturen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Folgende Nährlösungen fanden für die Anzucht der Zellsuspensionskulturen Verwendung:

LS	nach LINSMAIER und SKOOG (1965)
4X	nach GAMBORG <u>et al.</u> (1968), modifiziert wie ULBRICH und ZENK (1979)
DAX	nach GAMBORG <u>et al.</u> (1968), modifiziert wie ZENK <u>et al.</u> (1975)
B5C2	nach GAMBORG <u>et al.</u> (1968)
AP	nach ZENK <u>et al.</u> (1977)

Zellkultur	Medium	Erhaltung	Wuchsdauer (Tage)	Produktion
<u>Amsonia ciliata</u> Walt.	4X	7		24
<u>Ochrosia elliptica</u> Labil.	DAX	7		21
<u>Rhazya stricta</u> Decne.	4X/AP-Try	7		16
<u>Stemmadenia tomentosa</u> Green- <u>man var. palmeri</u> (Rose)	4X/LS	5-7		14
<u>Tabernaemontana divaricata</u> <u>R.Br. ex Roem. et Schult.</u>	DAX	7		18
<u>Tabernanthe iboga</u> Baill.	4X	7		21
<u>Voacanga africana</u> Stapf.	4X/AP	7-10		20
<u>Nuclea latifolia</u> Smith (Rubiaceae)	4X	5-7		21
<u>Uncaria gambir</u> (Hunter) Roxb. (Rubiaceae)	4X	7		21

Tabelle 1 : Wuchsbedingungen der bearbeiteten Zellsuspensionskulturen,
bis auf die zwei Rubiaceae alles Apocynaceae.

NAX nach GAMBORG et al. (1968), modifiziert wie ZENK et al. (1975)

1.3. Frisch- und Trockengewichtsbestimmung

Durch Vakuumfiltration wurde das Gewebe von dem Medium abgetrennt und gewogen. Zum Trocknen wurden die Zellen 48 Stunden bei 60°C im Trockenschrank getrocknet, anschließend gewogen und das Trockengewicht bezogen auf 1 Liter Medium berechnet.

1.4. Bestimmung der Parameter des Mediums

Die Untersuchungen des Kulturmediums konnten nach dem Abfiltrieren der Zellen durchgeführt werden. Zur Saccharosebestimmung wurde ein Abbé-Refraktometer der Firma Zeiss verwendet. Die Leitfähigkeit und der pH-Wert wurden mit einem Meßgerät der Firma WTW (Wissenschaftlich-Technische-Werkstätten Weilheim) bestimmt.

2. Chemikalien

Die deuterierten Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie stammen von der Firma Merck, Sharp und Dohme (München). Radiochemikalien wie $^3\text{H}_2\text{O}$ wurden von der Firma Amersham-Buchler (Braunschweig) bezogen.

Referenzalkaloide wurden mir freundlicherweise überlassen von:

Prof. H. Achenbach (Erlangen), Prof. G. Cordell (Illinois), Prof. C. Djerassi (Stanford) und Prof. R. Verpoorte (Leiden).

Alle übrigen Chemikalien und Lösungsmittel stammen von den üblichen Quellen und waren von größtmöglicher Reinheit.

3. Geräte

Massenspektren erhielt man an einem Finnigan MAT 44 S Massenspektrometer mit Elektronenstoßionisation (EI, 70 eV) oder chemischer Ionisation (CI, 180 eV). Das Gerät arbeitet nach dem Quadropolprinzip und ist mit einer kombinierten EI-CI-Quelle ausgerüstet.

GC-MS-Messungen wurden mit dem angeschlossenen Varian Gaschromatographen Modell 3700 und einer SE 50 Kapillarsäule mit Helium als Trägergas durchgeführt. Die Verbindung der Geräte erfolgte durch eine

offene Kopplung. Für die Ausgabe der Spektren stand eine Textronix 4632 Video Hard Copy Einheit und ein Hewlett Packard 9872 B Plotter zur Verfügung.

Hochauflösende Massenspektren konnten an einem Finnigan MAT 212 mit einem angeschlossenen SS 200 Datensystem und einem VG-ZAB Instrument für die peak matching Technik gemacht werden.

UV-Spektren wurden an einem 551 S UV/VIS-Spektrometer der Firma Perkin Elmer gemessen. Lösungsmittel war Methanol. Alkaloidkonzentrationen wurden nach dem Lambert Beer'schen Gesetz berechnet. Die dazu notwendigen Extinktionskoeffizienten werden bei den jeweiligen Alkaloiden angegeben. Die optische Drehung wurde an einem Perkin Elmer Polari-meter 241 in einer 1 ml bzw. 100 µl Küvette mit Chloroform als Lösungsmittel bestimmt.

Infrarotspektren wurden mit dem IR-Gitterspektrometer 257 der Firma Perkin Elmer aufgenommen.

¹H-NMR-Spektren wurden bei 500, 400, 300, 200 MHz mit Bruker WM 500, AM 400, AM 300, WP 200 und Nicolet QE 300 bestimmt. ¹³C-NMR-Spektren wurden mit einem WM 400 bei 100,6 MHz und einem WP 200 bei 50,3 MHz gemessen. Die chemischen Verschiebungen (δ) werden in ppm, die Kopplungskonstanten (J) in Hz angegeben. Signalmultiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s=Singulett, d=Dublett, t=Triplett, m=Multiplett, br=breit.

Alle säulenchromatographischen Reinigungsschritte wurden an einer Chromatographiestation der Firma LKB (Bromma, Schweden), bestehend aus einem Multirac 2111 Fraktionskollektor, einem Uvicord S II und einem Copper Bar Recorder durchgeführt.

Für Radioaktivitätsmessungen stand ein Betaszint BF 5000 Szintillationszähler der Firma Berthold zur Verfügung. Die Messung erfolgte mit 5 ml Quickszint der Firma Roth. Die Auswertung von radioaktiven Dünnschichtchromatogrammen erfolgte mit einem LB 2722-2 Dünnschichtscanner der Firma Berthold.

HPLC-Messungen wurden mit einem Spectra Physics Gerät gemacht, bestehend aus: SP 4100 Computer-Integrator, SP 8440 UV/VIS-Detektor, SP 8700 Pumpensteuerung, einem automatischen Probengeber ASI-150, einem ABC-Umschaltventil (beide Geräte Firma Analytische Biochemie GmbH) und einem LKB Fraktionskollektor.

Für die Gefriertrocknung stand eine Edwards Gefriertrocknungsanlage zur Verfügung.

Die CD-Spektren wurden an einem Dichrograph V (ISA, Unterhaching) ausgerüstet mit einem Silex Datensystem (Leanord, Lille) mit modifizierter Software aufgenommen.

4. Synthesen

4.1. Synthese von [^3H -Aryl] -Tabersonin und [^3H -Aryl] -Stemmadenin

Der Austausch von aromatischen Protonen durch ^3H im sauren Milieu ist eine der wichtigsten Methoden bei der Herstellung radioaktiv markierter Verbindungen. Das von MICCINO et al. (1978) beschriebene Verfahren bietet die Möglichkeit, schnell und in hoher Ausbeute, markierte Substanzen herzustellen, die auf andere Weise nur schwer zugänglich sind. Die Markierung erfolgte in zwei Spitzkolben, die durch ein Bogenrohr mit Auslaßbahn miteinander verbunden waren. In einen Kolben wurden 10 mg Tabersonin eingewogen, in den anderen Kolben wurden unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff zuerst frisch destilliertes Acetylchlorid und darüber 0,25 ml $^3\text{H}_2\text{O}$ (1,25 Ci) eingefroren. Beide Kolben wurden dann am Bogenrohr befestigt. Unter starker Gasentwicklung erfolgte bei Raumtemperatur die Reaktion von Acetylchlorid mit dem tritierten Wasser zu tritierter Essigsäure und Salzsäure. Der Kolben mit der ^3H -Essigsäure wurde nach einer Stunde wieder eingefroren, daraufhin das gesamte System evakuiert und das Reaktionsgemisch in den Kolben mit dem Tabersonin übersublimiert. Nach Belüftung mit Stickstoff wurde bei 0°C 14 Stunden im Dunkeln gerührt. Durch Rücksublimation konnte das $\text{CH}_3\text{COO}^3\text{H}/\text{HCl}$ -Gemisch vom Tabersonin entfernt werden. Das so radioaktiv markierte Produkt wurde in Methanol aufgenommen und dünnschichtchromatographisch gereinigt. Die spezifische Aktivität betrug 34,82 $\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$ bei einer Ausbeute von 38,2%.

Nach derselben Methode wurde Stemmadenin radioaktiv markiert. Die spezifische Aktivität betrug 44,2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$, die Ausbeute 23,8%.

4.2. Synthese von 1,2-Dehydro-14,15-epoxyaspidospermidin

Zur oxidativen Umwandlung von Conoflorin zu 1,2-Dehydro-14,15-epoxyaspidospermidin wurde 1 mg Conoflorin in 1 ml reinem Dimethylformamid und 350 μl Wasser gelöst. Zu der auf -10°C abgekühlten Mischung

tropfte man unter Rühren 300 µl einer wässrigen Kaliumpermanganatlösung (4,4 mM). Nach einer Stunde wurde mit 0,7 ml Eiswasser verdünnt und sofort unter Kühlung mit Ether ausgeschüttelt (analog nach BYCROFT et al. (1964)).

5. Chromatographische Verfahren

5.1. Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Alkaloide erfolgte mit Kieselgel DC-Fertigplatten Polygram Sil G/UV 254 der Firma Macherey und Nagel, teilweise mit Kammer sättigung.

Folgende Fließmittel (FM) wurden verwendet:

- FM 1 Chloroform:Methanol:Ammoniak = 90:10:0,2
- FM 2 Aceton:Petrolether:Diethylamin = 7:2:1
- FM 3 Aceton:Petrolether:Diethylamin = 2:7:1
- FM 4 Aceton:Petrolether:Diethylamin = 1:8:1
- FM 5 Aceton:Petrolether:Diethylamin:Methanol = 5:3:0,5:3
- FM 6 Butanol:Eisessig:Wasser = 10:10:1
- FM 7 n-Hexan:Ether = 1:1
- FM 8 n-Hexan:Ether:Diethylamin = 10:10:1
- FM 9 Chloroform:Methanol:Diethylamin = 7:3:1
- FM 10 Essigester:Methanol:Diethylamin = 70:5:5
- FM 11 Benzol:Essigester:n-Hexan:Ether = 15:20:20:40
- FM 12 Benzol:Essigester:Ether:Methanol:Diethylamin = 15:5:40:8:0,5
- FM 13 Xylol:n-Hexan:Essigester:Ether = 2:2:1:5
- FM 14 Xylol:n-Hexan:Essigester:Ether:Diethylamin = 2:2:1:5:1
- FM 15 Xylol:n-Hexan:Essigester:Ether:Diethylamin:Aceton = 2:2:1:3:1:1
- FM 16 n-Hexan:Chloroform:Methanol:Ammoniak = 5:5:0,5:0,2

Die Detektion der Alkaloide erfolgte mit:

Ammonium-Cer(VI)-sulfat 5 % in konz. Phosphorsäure und mit Dragendorff Reagenz.

5.2. Säulenchromatographie

Zur Auftrennung großer Alkaloidmengen (größer 100 mg) durch Säulen chromatographie wurden Glassäulen unterschiedlicher Längen und Durchmesser verwendet. Das Kieselgel 60, Korngröße kleiner 0,063 mm wurde von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen. Zum Auffangen und Detektieren

der Fraktionen stand eine LKB-Chromatographiestation zur Verfügung.

5.2.1. Trennsystem für Ochrosia elliptica :

Säulenmaße	3,7 x 70 cm
Säulenmaterial	Kieselgel 60, 200 g
Kieselgelsäule nach	
Äquilibration	42 cm
Probenvolumen	10 ml
Fließmittel	Chloroform:Methanol:Ammoniak = 90:10:0,2 (= FM 1)
Flußrate	0,9 ml/min

5.2.2. Trennsystem für Rhazya stricta:

Säulenmaße	4,2 x 70 cm
Säulenmaterial	Kieselgel 60, 150 g
Kieselgelsäule nach	
Äquilibration	31 cm
Probenvolumen	10 ml
Fließmittel	Chloroform:Methanol:Ammoniak = 90:10:0,2 (= FM 1)
Flußrate	1 ml/min

5.2.3. Trennsystem für Voacanga africana

Säulenmaße	4,5 x 65 cm
Säulenmaterial	Kieselgel 60, 300 g
Kieselgelsäule nach	
Äquilibration	45 cm
Fließmittel	n-Hexan:Ether = 1:1 (= FM 7)
Flußrate	0,5 ml/min

5.3. Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC-Methode hat schon seit einiger Zeit große Bedeutung bei der Isolierung und Identifizierung von Alkaloiden (KOHL et al. 1981,1983). Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der schnellen, exakten und reproduzierbaren Meßmöglichkeit auch kleinster Alkaloidmengen (kleiner 1 µg). Für analytische Zwecke wurde eine Hibar Lichro Cart RP 18 Säule

(0,4 x 25 cm) mit einer Korngröße von 7 µm verwendet. Als Fließmittel diente ein Gemisch aus Acetonitril und Wasser (10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$). Die Flußrate betrug 1 ml/min. Die Detektion erfolgte mit einer, dem jeweiligen Alkaloidchromophor angepassten Wellenlänge.

Für präparative Anwendungen wurde eine Macherey und Nagel Trennsäule Nucleosil 7C RP (1,0 x 25 cm) verwendet. Zur Trennung großer Alkaloidmengen war es möglich mit dem automatischen Probengeber mehrere Analysenläufe hintereinander anzusteuern und mit Hilfe des ABC-Sammelventils maximal 5 Rohfraktionen aufzufangen.

5.4. Quantitative Auswertung des Alkaloidgehaltes mit Hilfe der HPLC-Analytik

Zur quantitativen Bestimmung der Alkaloide wurden von den interessierenden Substanzen Lösungen definierten Gehaltes bereitet und als externer Standard vor oder zwischen den Analysenläufen gemessen. Der Spectra Physics SP 4100 Rechner-Integrator besitzt ein festes Programm, bei dem jeder Peak der zu analysierenden Probe mit dem entsprechenden Peak der Eichlösung verglichen werden kann. Durch Bestimmung des Verhältnisses von Eichlösung und Analysenprobe ist es möglich quantitative Aussagen zu machen.

5.5. Flüssig-flüssig Chromatographie

Ein schonendes chromatographisches Verfahren, bei dem alle aufgetragenen Substanzen wieder rückgewonnen werden können, ist die DCCC-Methode (= Droplet-Counter-Current-Chromatography). Es handelt sich dabei um eine Verteilungschromatographie, bei der die mobile und die stationäre Phase flüssig, aber nicht miteinander mischbar sind. Die Trennung der Substanzen erfolgt auf Grund ihrer unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten zwischen der als Tröpfchen vorliegenden mobilen Phase und der in Glassäulen gefüllten stationären Phase (Übersicht bei HOSTETTANN 1980).

Für die Trennung des Voacanga aficana Rohextraktes wurde der Büchi-DCC-Chromatograph B 670 mit 288 Säulen verwendet.

Fließmittel die gesättigten Phasen der Mischung aus CHCl_3 :
 MeOH:H₂O im Verhältnis 13:7:4

Stationäre Phase wässriger Anteil

Mobile Phase	organischer Anteil
Probenvolumen	15 g gelöst in einer 1:1 Mischung aus stationärer und mobiler Phase: 15 ml
Flußrate	0,7 ml/min

6. Spektroskopische Methoden

6.1. Massenspektroskopie

Die Massenspektroskopie hat in den letzten 20 Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen, da mit kleinsten Substanzmengen (kleiner 1 µg) sehr gute Spektren gemessen werden können. Es ist dabei nicht nur möglich das Molekulargewicht einer Substanz zu bestimmen, sondern auf Grund des Fragmentierungsmusters, d.h. durch den Zerfall der Probe unter dem Einfluß des Elektronenbeschusses, lassen sich genaue Aussagen über die Struktur einer Verbindung machen. Für Substanzen, die nur einen sehr kleinen Molekularpeak zeigen oder Verbindungen hoher Polarität wurden Verfahren entwickelt, die auch hier eine genaue Molekulargewichtsbestimmung zulassen (CI, DCI, Feldionisation usw.).

6.1.1. Chemische Ionisation (CI)

Im Gegensatz zur Elektronenstoßionisation werden bei der CI-Methode Ionen durch Ionen-Molekül-Reaktionen in der Gasphase erzeugt. Dazu wird ein Reaktantgas durch Elektronenbeschuss ionisiert. Die entstandenen Ionen können einerseits direkt mit den Probenmolekülen reagieren und diese durch Ladungsaustausch ionisieren, andererseits durch interne Molekülreaktionen reaktive Ionen bilden, die dann die Probenmoleküle durch Protonenübertragung oder durch Anlagerung ionisieren. Um Zusammenstöße von Reaktantgas und Probe möglich zu machen muß der Druck in der Ionenquelle wesentlich höher sein als in der normalen EI-Quelle. Das Finnigan MAT 44 S Massenspektrometer ist mit einer kombinierten EI-CI-Ionenquelle ausgestattet, die ein problemloses Umschalten von EI- auf CI-Bedingungen möglich macht.

CI-Massenspektren haben große Ähnlichkeit mit EI-Spektren. Charakteristisch sind allerdings die gegenüber der EI-Methode deutlich verminderte Intensität der Fragment-Ionen und das Auftreten eines intensiven $M + H^+$ -Peaks, der durch die Protonierung des Moleküls entsteht. Die

relativ geringe Fragmentierung ist darauf zurückzuführen, daß ein $M + H^+$ -Ion kein radikalisches Zentrum besitzt, durch das viele Fragmentierungen hervorgerufen oder erleichtert werden. Auf Grund des relativ hohen Druckes in der Ionenquelle können die gebildeten Ionen durch Stöße einen Teil ihrer Anregungsenergie wieder abgeben.

Durch die Wahl des Reaktionsgases läßt sich das Ausmaß der Fragmentierungsreaktionen einer Verbindung innerhalb weiter Grenzen variieren. Eine relativ starke Fragmentierung erhält man bei der Verwendung von Edelgasen oder Wasserstoff, die eine kleine Protonenaffinität besitzen. Nimmt man Kohlenwasserstoffe, werden die Probenmoleküle hauptsächlich durch Protonenübertragung ionisiert. Die übertragenen Energiebeträge sind im allgemeinen kleiner, wodurch die Fragmentierung deutlich vermindert wird. Die geringste Fragmentierung erhält man bei stickstoffhaltigen Reaktionsgasen wie z.B. Ammoniak (vergl. RICHTER et al. 1978). Im Folgenden wurde Isobutan als Reaktantgas verwendet.

6.1.2. Direkte Chemische Ionisation (DCI)

Die direkte chemische Ionisation oder Desorptionschemische Ionisation geht auf BALDWIN und MC LAFFERTY (1973) zurück. Bei dieser Methode können auch von schlecht verdampfenden Verbindungen gute CI-Spektren erhalten werden. Dabei wird die Probe auf einen Rheniumdraht von 0,1mm Durchmesser aufgetragen, der sich auf der Spitze einer Schubstange befindet. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wird die Schubstange so weit in die Ionenquelle eingeschoben, bis der Faden in das ionisierte Gas ragt. Während des Aufheizprogrammes verdampft die Probe bei niedriger Temperatur direkt in der Ionisierungskammer. Man erhält DCI-Spektren, die den CI-Spektren sehr gleichen. Im Vergleich zu der normalen CI-Methode entfällt das Verdampfen aus dem Tiegel und die damit verbundene hohe thermische Belastung, die zur Zersetzung vor der Ionisation führen kann.

6.2. GC-MS-Kopplung

Die Kopplung von Gaschromatographen und Massenspektrometer ist zu einer Standardmethode in der organisch-analytischen Chemie geworden

(GUDZINOWICZ et al. 1976). Diese Methode eignet sich von der Reinheitsprüfung bis zur Auftrennung sehr schwer trennbarer Substanzgemische, mit dem Vorteil einer exakten Identifizierungsmöglichkeit durch das aufgenommene Massenspektrum. Indolalakoide können, wenn sie eine geringe Polarität aufweisen, gut mit Hilfe der GC-MS-Analytik identifiziert werden.

Als Beispiel sei hier die GC-MS-Messung des Iboga-Alkaloids Coronaridin erläutert:

GC	Varian 3700
Säule	Kapillarsäule SE 54 (20 m)
Trärgas	Helium
Verbindung zum MS	offene Kopplung
Probenvolumen	1 μ l
Temperatur	200 °C isotherm
Retentionszeit	4,5 min

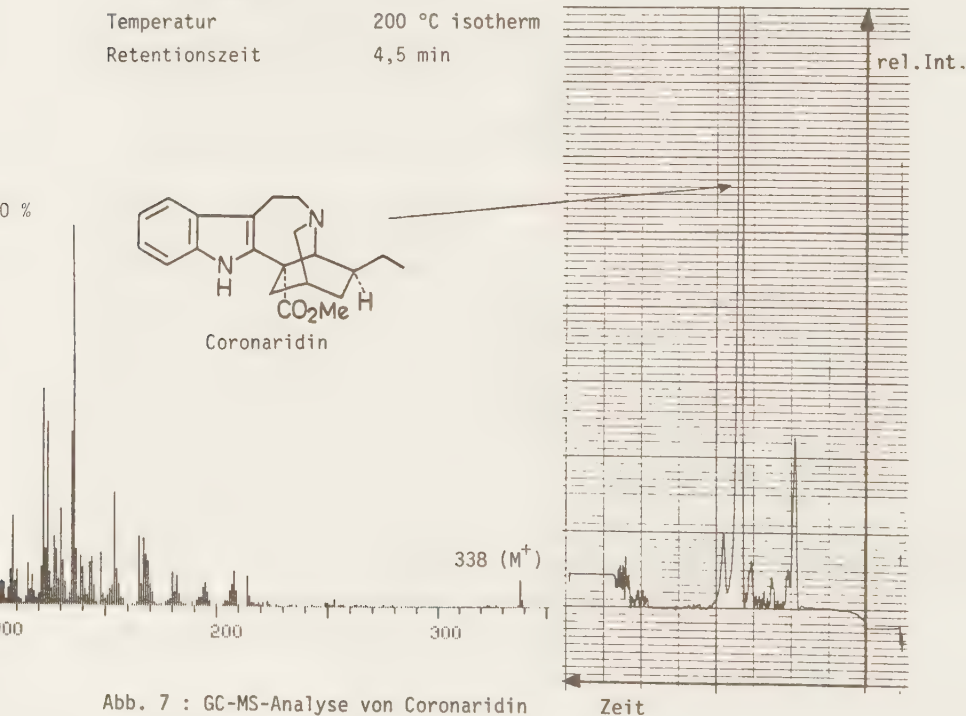
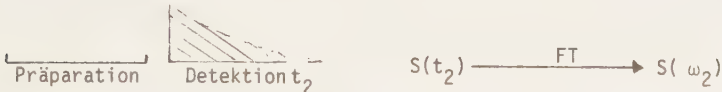


Abb. 7 : GC-MS-Analyse von Coronaridin

Etwa 25 µg Coronaridin wurden in 5 µl Essigester aufgenommen und 1µl dieser Lösung auf die Säule aufgegeben. Nach 4,5 min konnte Coronaridin massenspektroskopisch nachgewiesen werden.

6.3. Kernresonanz-Spektroskopie

Im Gegensatz zu dem Sweep-Verfahren, bei dem die eingestrahlte Wellenlänge kontinuierlich verändert wurde, wird bei den Puls-Fourier-Transformations-Verfahren (FT) die gesamte Spektrubreite gleichzeitig eingestrahlt. Im einfachen FT-Experiment wird durch ein starkes Hochfrequenzfeld, den sogenannten HF-Impuls, aus der longitudinalen oder z-Magnetisierung eine transversale oder Quermagnetisierung erzeugt (= Präparation). Anschließend wird deren zeitlicher Abfall, das FID-Signal (Free Induction Decay) gemessen (= Detektion, definitionsgemäß t_2). Die Fourier-Transformation liefert das FT-NMR-Signal $S(\omega_2)$:



Wichtigstes Charakteristikum aller neuen Pulsexperimente ist die sogenannte Evolutionszeit t_1 , die der Präparation nachgeschaltet ist. Hier kann sich das Spinnsystem, unter Einwirkung verschiedener Impulse, entwickeln. Die Datenaufnahme erfolgt erst nach dem Ende der Evolutionszeit in der Detektionszeit t_2 . Das Ergebnis ist ein Signal, das von t_2 und t_1 abhängig ist: $S(t_1, t_2)$.

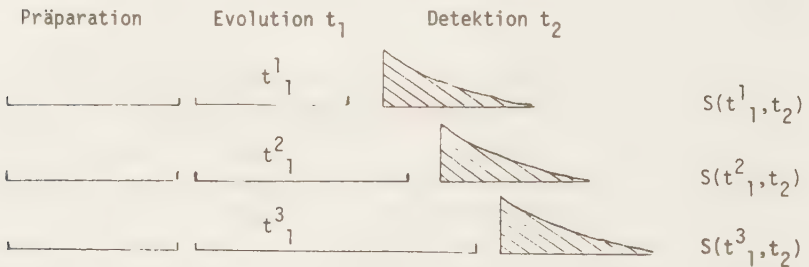
Ist die Evolutionszeit konstant, bleibt das Signal weiterhin nur eine Funktion von t_2 . Der Informationsgehalt des nach der Fourier-Transformation erhaltenen FT-NMR-Spektrums ist aber von der Evolutionszeit abhängig.



Ein Beispiel hierfür ist die DEPT-Pulsfolge (= Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer). Durch eine komplizierte Pulsfolge auf den Protonen- wie auch den ^{13}C -Bereich ergibt sich eine sichere Methode zur Unterscheidung von CH_n -Multipletts mit der Empfindlichkeitssteigerung des Polarisationstransfers (eine ausführliche Darstellung ist zu finden bei BENDALL et al. 1982). Dadurch wird es möglich $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}$ und quartäre C-Atome auf sehr einfache Weise zu unterscheiden.

Trotz der Vielzahl der möglichen Pulsexperimente blieb die Zuordnung der miteinander koppelnden Kerne oft weiterhin sehr schwierig. Durch Einführung der zweidimensionalen NMR-Technik konnte dieses Problem weitgehend gelöst werden.

Zu einer zweiten Dimension kommt man, wenn sich auch die Evolutionszeit ändert und wenn diese zweite Zeitvariable periodische Veränderungen der Signalamplitude (oder Signalphase) auslöst. Man erhält damit eine Serie von Signalen, die eine zweidimensionale Datenmatrix der Signalintensitäten $S(t_1, t_2)$ darstellt.



Nach der zeilenweisen Fouriertransformation der Detektionsphase t_2 erhält man für jedes Zeitinkrement t_1 ein Spektrum $S(t_1, \omega_2)$. Eine spaltenweise zweite Fouriertransformation führt zu einem 2D-Spektrum $S(\omega_1, \omega_2)$. Die Lage der Peaks in den beiden Koordinaten ω_1 und ω_2 wird durch die Bedingungen bestimmt, denen die Spins in den beiden Phasen (Entwicklungsphase $t_1 \longrightarrow \omega_1$, Detektionsphase $t_2 \longrightarrow \omega_2$) unterworfen waren.

Ein Beispiel ist das COSY-Experiment (Correlatet System, III 4.3.2.).

Das Ergebnis ist ein leicht zu interpretierendes zweidimensionales Spektrum, auf dessen Diagonalen durch die ω_1 - ω_2 -Ebene sich das normale NMR-Spektrum befindet. Alle Peaks, die nicht auf der Diagonalen liegen (die sogenannten Cross-Peaks), zeigen z.B. homonukleare ^1H - ^1H -Kopplungen an (Übersicht bei BENN et al. 1983).

7. Alkaloidisolierung aus pflanzlichem Material

Das pflanzliche Material wurde mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Bedarf in einer Analysenmühle der Firma Jahnke und Künkel (Staufen) zerkleinert. Zu den so zerstörten Zellen wurde die doppelte Menge Essigester zugegeben und bei +5°C im Kühlraum gerührt. Zusätzlich wurden noch alkalische Salze zugegeben, um die Alkaloide in ihre freie Base überzuführen. Die Gewebemasse wurde dann abfiltriert, die organische Phase mit einer kleinen Menge Wasser gewaschen und unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer eingengt. Die Extraktion der Alkaloide erfolgte mit 2%iger Schwefelsäure, die wässrigen Fraktionen wurden vereinigt und mit Natriumhydrogencarbonat auf pH 9 eingestellt. Die wässrige Phase wurde mit Chloroform ausgezogen, in dem sich dann der Rohextrakt befand (STÖCKIGT und SOLL 1980).

Die Isolierung der Alkaloide aus differenzierten Pflanzen verlief analog.

8. Herstellung zellfreier Proteinrohextrakte aus pflanzlichen Zellsuspensionskulturen

Das eingefrorene Zellmaterial wurde mit kaltem 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 und 10 mM Mercaptoethanol bis zum Auftauen bei Raumtemperatur gerührt (30 min). Die Zellmasse wurde durch Mull gepreßt und der Preßsaft 20 min bei 20000 x g klarzentrifugiert. Die im Überstand gelösten Proteine wurden mit Ammoniumsulfat gefällt (0-70% Sättigung). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min bei 48000xg) wurde das so erhaltene Sediment in einem möglichst kleinen Volumen Aufschlußpuffer suspendiert. Zur Abtrennung der niedermolekularen Anteile wurde daraufhin dieser Proteinrohextrakt über eine G 25 Säule gegeben.

9. Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden nach BRADFORD (1976) durchgeführt. Als Standard zum Aufstellen einer Eichgeraden diente Rinderserumalbumin.

III. E R G E B N I S S E

1. Alkaloide aus Amsonia ciliata Walt.

1.1. Beschreibung der Pflanze

Amsonia ciliata Walt. oder auch Amsonia angustifolia (Ait.) Michx. kommt in den USA, Mexico und Asien vor. Sie gehört innerhalb der Plumerioideae zusammen mit den Catharanthus-Arten in den Tribus der Alstonieae. Extrakte dieser Pflanze haben eine stimulierende Wirkung auf das zentrale Nervensystem, bewirken eine Erhöhung des arteriellen Blutdrucks und eine Verstärkung des Tonus der glatten Muskulatur (TOMCZYK 1964). Bis jetzt konnten 10 unterschiedliche Alkaloide isoliert werden, die zum Corynanthe-, Strychnos- und Aspidosperma-Typ gehören (BOJTJE-HORVATH et al. 1974). Die Pflanze zeigt damit eine große Vielfalt in der Alkaloidproduktion.

1.2. Beschreibung der Zellkultur

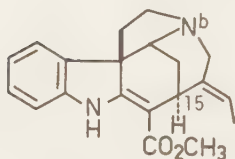
Der Kallus wurde aus steril gekeimten Samen angelegt. Das verwendete 4X-Medium wurde auch für die Kultivierung der Zellen im flüssigen Medium übernommen. Die hellgelbe Kultur ist sehr gut gewachsen, nach 24 Tagen Wuchsdauer konnten aus einem Liter Medium 240 g Zellmasse (Frischgewicht) abgeertet werden. Das Trockengewicht betrug 4,7 %. Für die Alkaloidisolierungen wurde 1,8 kg Gewebe herangezogen.

1.3. Aufarbeitung des Gewebes

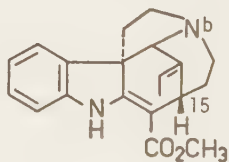
Für die Extraktion der Alkaloide wurden 1,8 kg A.ciliata Gewebe (84,6g Trockengewicht) zweimal mit 2,5 Liter Essigester 24 Stunden im Kühlraum gerührt, die organischen Phasen vereinigt und wie unter II 7 beschrieben aufgearbeitet. Der so erhaltene Alkaloidrohextrakt wurde dünnschichtchromatographisch im FM 5 aufgetrennt.

1.3.1. Alkaloidisolierung und Identifizierung

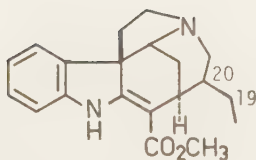
Mit einem R_f -Wert von 0,6 wurde eine Substanz isoliert, die mit Cer-sulfat eine blaue Färbung ergibt. Das UV-Spektrum hat die Maxima bei 326,295 und 228 nm, die für eine α -Methylenindolin-Struktur typisch sind, wie man sie bei Alkaloiden des Aspidosperma- und Strychnos-Typs findet. Im Massenspektrum ist der Molekularpeak bei 324 m/z zu sehen. Die weitere Fragmentierung mit den Peaks bei 295 ($M^+ - C_2H_5$), 229, 182, 180 und 167 m/z deutet auf ein hydriertes Akuammicin hin (PANAS et al. 1972). Man muß hier aber zwei Substanzen unterscheiden, die massenspektroskopisch das gleiche Fragmentierungsmuster aufweisen, deren Strukturen grundlegend verschieden sind. Auf der einen Seite das Akuammicin und das hydrierte Produkt 19,20-Dihydroakuammicin, auf der anderen Seite Condyllocarpin und 19,20-Dihydrocondyllocarpin (=Tubotaiwin).



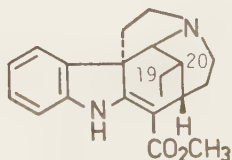
(-)-Akuammicin



(+)-Condyllocarpin



(-)-19,20-Dihydroakuammicin



(+)-19,20-Dihydrocondyllocarpin
(+)-Tubotaiwin

Alle diese α -Methylenindolin-Alkaloide zeichnen sich durch eine sehr große spezifische Drehung aus. Während Akuammicin und Dihydroakuammicin stark linksdrehend sind ($[\alpha]_D^{20} = -735^\circ$ bzw. -637°), zeigen Condyllocarpin und Tubotaiwin eine starke Rechtsdrehung ($[\alpha]_D^{20} = +900^\circ$ bzw. $+611^\circ$). Ausschlaggebend dafür ist die Stellung der Tryptaminbrücke vom Indolteil zum Stickstoff (N_b), die beim Akuammicin in β -, und bei dem Condyllocarpin oder Tubotaiwin in α -Stellung vorliegt.

Das gemeinsame Vorkommen beider Formen, nämlich (-)-12-OH-Akuammicin und (+)-Tubotaiwin und die gleiche absolute Konfiguration an C15 zeigt, daß eine gemeinsame Vorstufe vorhanden sein kann (vergl. III 6.4.).

Durch Bestimmung der optischen Drehung und Co-Chromatographie konnte eindeutig Tubotaiwin nachgewiesen werden, das erstmals aus Blättern von Pleiocarpa tubicina isoliert wurde (KUMP et al. 1964).

Verbindung	Identifizierung	Cer-Färbung	Alkaloid-Typ
Tubotaiwin	EI-MS, CI-MS, Co-Chr. $[\alpha]_D^{20}$	blau	S

Tabelle 2: Isolierte Verbindung aus A.ciliata
S=Strychnos

2. Alkaloide aus Tabernanthe iboga Baill.

2.1. Beschreibung der Pflanze

Die an der Westküste Afrikas vorkommende Pflanze Tabernanthe iboga wurde früher von den Eingeborenen bei Initiationsriten verwendet. Extrakte dieser Pflanze erzeugen ein Gefühl der Erregung, Verwirrtheit, halfen über Ermüdungserscheinungen hinweg und erzeugten möglicherweise auch Halluzinationen wie von LANDRIN 1905 beschrieben.

Stoffliche Grundlage dieser excitatorischen Effekte sind die zum Iboga-Typ gehörenden Alkaloide (RAYMOND-HAMET et al. 1960). Bis auf Conoflorin, ein Alkaloid aus der Aspidosperma-Reihe (GOUTAREL 1974) gehören alle weiteren isolierten Alkaloide zum Iboga-Typ (TAYLOR 1957, DICKEL et al. 1958). 10-Methoxyibogamin, ein Alkaloid, das in der Wurzel von Tabernanthe iboga vorkommt, wurde von der U.S. FAD (Food and Drug Administration) in die gleiche Kategorie wie das LSD gestellt.

Die Suspensionskultur dieser Pflanze sollte sich also bestens eignen Alkaloide zu isolieren, die vorwiegend dem Iboga-Typ angehören.

2.2. Beschreibung der Zellkultur

Die Kalluskultur wurde aus steril gekeimten Samen angelegt, die an der Küste von Äquatorialafrika gesammelt wurden. Als Wachstumsmedium bewährte sich das 4X Medium, das dann auch für die Kultivierung im flüssigen Medium übernommen wurde.

Für die Alkaloidisolierungen wurden 1,5 kg Gewebe (Frischgewicht) produziert. Pro Liter Medium konnten 228 g Frischgewicht abgeerntet werden, das Trockengewicht betrug 6,1 %.

2.3. Aufarbeitung des Gewebes

Für die Isolierung der Alkaloide wurden 1,5 kg eingefrorenes T. iboga Gewebe (91,5 g Trockengewicht) mit 3 Liter Essigester einen Tag lang bei 8°C im Kühlraum extrahiert. Vorher wurden 60 ml eines Na_2HPO_4 -

Puffers pH 9 zugegeben, um die Alkaloide in ihre freie Base überzuführen. Das Verfahren wurde zweimal wiederholt, um eine annähernd erschöpfende Extraktion zu erreichen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, eingedampft und nach der unter II 7 beschriebenen Methode aufgearbeitet. Die nach dem Ausschüttelgang erhaltene Chloroformphase wurde dünnschichtchromatographisch im FM 10 aufgetrennt. Es konnten 3 Verbindungen eluiert werden (PAWELKA et al. 1983).

Isolierungsschema :

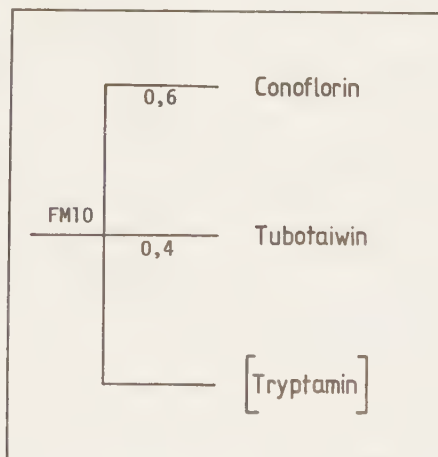
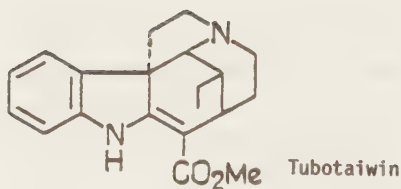


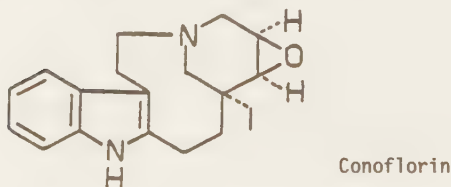
Abb. 8: Hauptalkaloide aus *Tabernanthe iboga*, Banden 1-3 von unten nach oben. Die Zahlen geben die jeweiligen Rf-Werte an.

2.3.1. Alkaloidisolierungen und Identifizierung

Bande 2 mit einem Rf-Wert von 0,4 wurde im FM 1 nochmals gereinigt. Die isolierte Substanz zeigt eine blaue Cer-Färbung. Sowohl das UV- wie auch das Massenspektrum stimmt mit dem bei A. ciliata beschriebenen Tubotaiwin überein. Die Bestimmung der optischen Drehung und Co-Chromatographie brachten einen zusätzlichen Nachweis für Tubotaiwin.



Bande 3 wurde im FM 13 rechromatographiert. Die Substanz zeigt nach Besprühen mit Cer-Reagenz eine rote Färbung. Das UV-Spektrum mit den Maxima bei 292, 286 und 230 nm ist typisch für den Indolchromophor, im Massenspektrum liegt der Molekularpeak bei 296 m/z. Das Fragmentierungsmuster mit den signifikanten Peaks bei 267 ($\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_5$), 249, 157 und 122 m/z zeigt, daß es sich hier um ein epoxydiertes Quebrachamin, nämlich Conoflorin handelt. Diese Verbindung wurde erstmals aus den Blättern und der Rinde der auch namengebenden Pflanze Cono-pharyngia longiflora isoliert (DUGAN *et al.* 1967). Die absolute Konfiguration mit der β -ständigen Epoxyfunktion wurde von KUNESCH *et al.* (1971) durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Die Substanz ist dem Aspidospermidin biogenetisch verwandt, sie gehört in die Reihe der Aspidosperma-Alkaloide.



Mit Bande 1 sei noch auf Tryptamin hingewiesen, das durch UV- und Massenspektrum gut identifiziert werden konnte.

2.4. Untersuchungen zur enzymatischen Umsetzung von Conoflorin

Conoflorin eignet sich auf Grund der offenen Struktur gut als Objekt für die Diskussion um die Bildung von Alkaloiden des Aspidosperma-Typs. Hier steht ganz besonders die Bildung von 1,2-Dehydroaspidospermidin im Vordergrund, also das Knüpfen der Bindung zwischen C7 und C21. Diese Verknüpfung ist auch im Hinblick auf die Biosynthese

der Aspidosperma-Alkaloide von großem Interesse (KUTNEY et al. 1964).

Der umgekehrte Weg, die Umwandlung von 1,2-Dehydroaspidospermidin zu Quebrachamin mit Kaliumborhydrid wurde von Plat et al. (1962 a) und SMITH et al. (1963) durchgeführt.

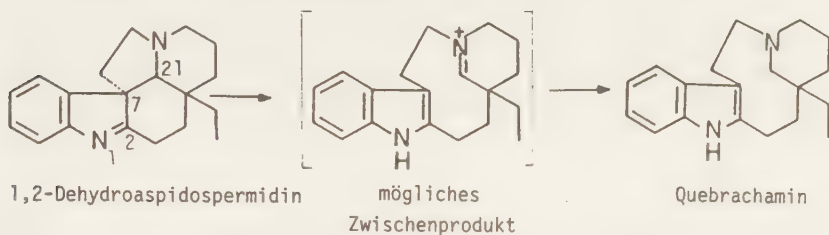


Abb. 9: Umsetzung von 1,2-Dehydroaspidospermidin zu Quebrachamin

Es müßte also möglich sein, mit Hilfe geeigneter Oxidationsmittel eine Rückreaktion zu erreichen. Dies konnte von BYCROFT et al. (1964) am Beispiel von Quebrachamin bewiesen werden.

2.4.1. Synthese von 1,2-Dehydro-14,15-epoxyaspidospermidin

Entsprechend dem oben erwähnten Verfahren wurde Conoflorin umgesetzt (vergl. II 4.2.) und es entstand eine Verbindung mit einem Molekulargewicht, das um zwei Masseneinheiten kleiner war als das Ausgangsprodukt. Es handelt sich um das 1,2-Dehydro-14,15-epoxyaspidospermidin. Sowohl das UV-Spektrum, wie auch die für das 1,2-Dehydroaspidospermidin typische orangene Cer-Färbung (SMITH et al. 1963) bestätigen dies.



Abb. 10: Umwandlung von Conoflorin zu 1,2-Dehydro-14,15-epoxyaspidospermidin nach BYCROFT et al. (1964).

Bei der chemischen Umsetzung mit Kaliumpermanganatlösung entstand aber als Hauptprodukt eine Verbindung mit einem Molekulargewicht von 310 m/z, also um 14 Masseneinheiten höher wie das Ausgangsprodukt. Die Substanz zeigt das übliche UV-Spektrum des Indolchromophors, aber keine Cer-Färbung. Vergleicht man die Massenspektren von Conoflorin und der unbekannten Substanz, fällt auf, daß sich im wesentlichen (außer dem Molekularpeak) nur ein Peak verschoben hat: das Fragment 140 m/z im Conoflorin ist bei der neuen Substanz nicht vorhanden, dafür sieht man aber einen Peak bei 170 m/z (vergl. Abb. 11,12).

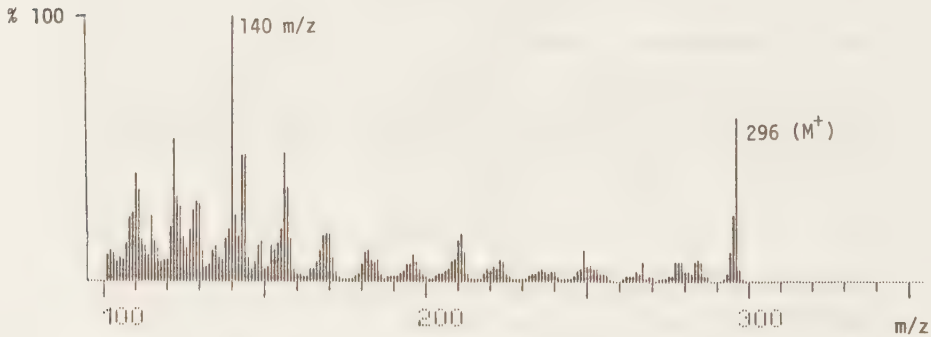


Abb. 11: Massenspektrum des Conoflorins

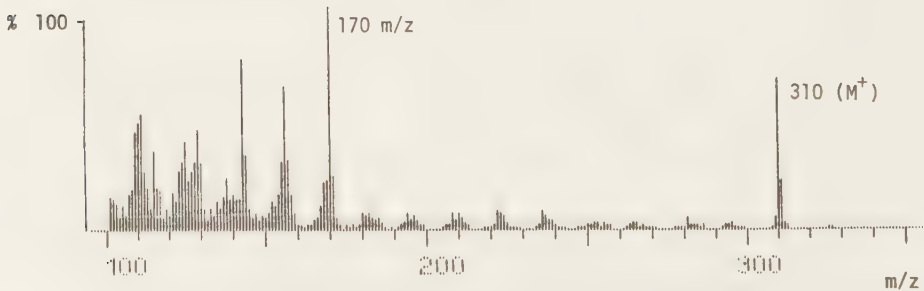


Abb. 12: Massenspektrum des Hauptproduktes aus der oxidativen Umwandlung des Conoflorins.

Ein Vergleich beider Fragmentierungsmuster sollte Aufschluß darüber geben, ob die, für die Erhöhung des Molekulargewichtes notwendige Substitution im aliphatischen oder aromatischen Bereich des Conoflorins erfolgt ist. Wie aus Tabelle 3 ersichtlich ist, kann die Substitution nur im aliphatischen Bereich erfolgt sein, da alle Fragmente des Indolteils mit denen des Conoflorins übereinstimmen. BYCROFT et al. (1964) erwähnen ebenfalls Verbindungen als Hauptprodukte, die als Lactame bezeichnet, aber nicht näher identifiziert wurden.

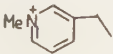
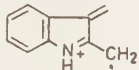
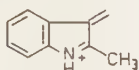
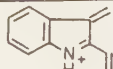
Fragment	m/z	Conoflorin	310
	122	+	-
	140	+	-
	143	+	+
	144	+	+
	156	+	+

Tabelle 3: Hauptfragmente von Conoflorin und der unbekannten Substanz isoliert aus Tabernanthe iboga

Außer dem unbekannten Hauptprodukt ist aber auch das 1,2-Dehydro-14,15-epoxyaspidospermidin entstanden. Durch eine chemische Reaktion war es also möglich eine Bindung zwischen C 7 und C 21 im Conoflorin

zu knüpfen und damit ein Alkaloid des Aspidosperma-Typs herzustellen. Daher erschien es interessant zu prüfen, ob die gleiche Reaktion auch enzymatisch katalysiert erfolgen kann. Zu diesem Zweck wurde wie unter II 8 beschrieben ein Enzymrohextrakt aus Tiboga Gewebe hergestellt. 4 µg Conoflorin wurden zusammen mit 5 ml Rohextrakt (12 mg Protein) und 6,7 µM NADP⁺ in einem 1M Kaliumphosphatpuffer (pH 7, Gesamtvolumen 10 ml) für 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Danach erfolgte eine Extraktion mit Essigester. Im FM 11 wurden die entstandenen Produkte getrennt und die Massenspektren der isolierten Verbindungen gemessen.

Als Hauptprodukt konnte wiederum die schon oben beschriebene Substanz mit dem Molekulargewicht von 310 identifiziert werden.

Zusätzlich waren noch zwei Verbindungen isolierbar, die durch Öffnung des Epoxyringes und Kondensation mit dem im Rohextrakt vorhandenen Mercaptoethanol entstanden sind. Das Ausgangsprodukt Conoflorin war nicht mehr zu finden, das eingesetzte Substrat ist somit vollständig umgesetzt worden.

Beim Vergleich von Enzymrohextrakten unterschiedlicher Gewebe zeigte sich ein Umsatz von Conoflorin bei:

- Stemmadenia tomentosa
- Rhazya stricta
- Catharanthus roseus

kein Umsatz bei:

- Voacanga africana
- Picralima nitida

Die dabei entstandenen Verbindungen sind keine Artefakte, da in den beiden Kulturen von Voacanga africana und Picralima nitida Conoflorin bei gleichen Reaktionsbedingungen nicht umgesetzt wurde. Die Epoxyfunktion scheint einen wesentlichen Einfluß auf den Umsatz von Conoflorin zu haben, denn Quebrachamin, das dem Conoflorin analoge Alkaloid ohne den Epoxyring wird von keinem der beschriebenen Enzymrohextrakte umgesetzt.

Verbindung	Identifizierung	Cer-Färbung	Alkaloid-typ
Tubotaiwin	UV,EI-MS,CI-MS,Co-Chr.	blau	S
Conoflorin	UV,EI-MS,CI-MS,DCI-MS Co-Chr.	rot	A

Tabelle 4: Isolierte Verbindungen aus Tabernanthe iboga
S= Strychnos- , A= Aspidosperma-Typ

3. Alkaloide aus Tabernaemontana divaricata R.Br.ex Roem.et Schult.

3.1. Beschreibung der Pflanze

Die Pflanzen des Tribus Tabernaemontaneae sind weit verbreitet und stellen neben Carisseae und Alstonieae eine der größten Gruppen innerhalb der Apocynaceae dar. Bezüglich ihres Alkaloidgehaltes sind sie sehr intensiv untersucht worden (GORMANN et al. 1960, RAJ et al. 1974).

Tabernaemontana divaricata ist ein kleiner immergrüner Busch von 1-2,5 m Höhe, mit weißen Blüten. Er kommt hauptsächlich in Indien als Zierpflanze vor, aber auch in Australien und Ägypten. Extrakte der Wurzeln wurden bei Gallenleiden, Blutkrankheit, Epilepsie, Lähmungen und Scorpionstichen angewandt. Der Milchsaft wurde in der indischen Heilmedizin äußerlich bei Augenleiden benutzt (TALAPATRA et al. 1975).

An Inhaltsstoffen wurden Terpene, Sterole und die Indolalkaloide Conoflorin, Coronaridin, 3-Oxocoronaridin, Dregamin, Lochnericin, Tabernaemontanin, Voacangin und Voacristin gefunden. Es handelt sich dabei um Alkaloide vom Aspidosperma- und Iboga-Typ.

Gesichert ist die Wirkung von Coronaridin auf das Nervensystem mit analgetischem und sedativem Effekt (ZETTLER 1964, ZETTLER et al. 1968). Dregamin zeigt eine deutliche Wirkung auf das zentralnervöse System (ALBERT et al. 1970). Erst in letzter Zeit wurden bei umfangreichen pharmakologischen Untersuchungen von Tabernaemontana-Arten auch antimikrobielle Wirkungen festgestellt (VAN BEEK et al. 1984).

3.2. Beschreibung der Zellkultur

Die Kultur von T. divaricata wurde aus steril gekeimten Samen angelegt. Als Wachstumsmedium diente das DAX-Medium, das auch für die Kultivierung in der Suspension genommen wurde.

Für die Bestimmung des Alkaloidmusters wurden 6kg Gewebe herangezogen. Pro Liter Medium konnten nach einer durchschnittlichen Wachstumsperiode von 18 Tagen 320 g Gewebe abgeerntet werden. Das Trockengewicht betrug 6,2 %. Nach Entfernen des Kulturmediums durch Filtration wurde das Gewebe mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C

aufbewahrt.

3.3. Aufarbeitung des Gewebes

Für die Isolierung der Alkaloide wurden 6 kg *T.divaricata* Gewebe (372 g Trockengewicht) zweimal mit 6,5 Liter Essigester und 200 ml eines 1M Kaliumphosphatpuffers (pH 9) im Kühlraum 48 Stunden bei +5°C gerührt. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit Wasser nachgewaschen und auf ca. 200 ml eingengt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter II 7 beschrieben.

Der so erhaltene Alkaloidrohextrakt wurde über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Im FM 15 konnten 6 alkaloidführende Banden isoliert werden (PAWELKA et al. 1983).

Isolierungsschema :

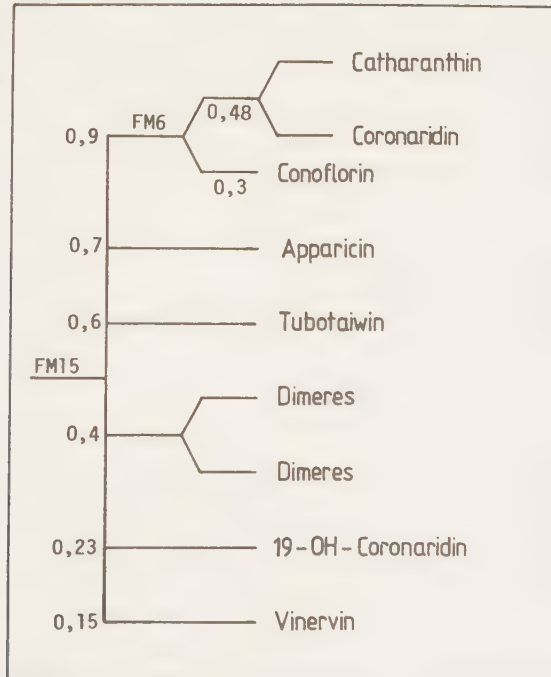
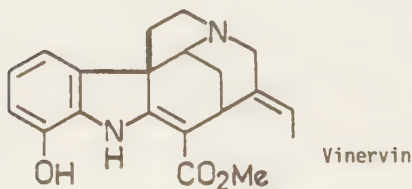


Abb. 13: Hauptalkaloide aus *Tabernaemontana divaricata* (Banden 1-6 von unten nach oben). Die Zahlen geben die jeweiligen Rf-Werte an.

3.3.1. Alkaloidisolierungen und Identifizierung

Bande 1 mit einem Rf-Wert von 0,15 im FM 15 zeigt die höchste Polarität von allen identifizierten Alkaloiden. Im FM 1 konnte der Großteil der noch vorhandenen Verunreinigungen entfernt werden.

Die isolierte Substanz hat eine rötliche Cer-Färbung und bei 366 nm eine weißlich-gelbe Fluoreszenz. Im UV-Spektrum sind die Maxima bei 337, 290 und 235 nm (Schulter), im Massenspektrum war der Molekularpeak bei 338 m/z zu erkennen. Ein starker bathochromer shift ($\lambda_{\max}$ 337 $\longrightarrow$ 355 nm) in Anwesenheit von NaOH gibt einen Hinweis auf eine phenolische Hydroxylgruppe. Die dem Akuammicin sehr ähnliche Fragmentierung im Massenspektrum deutet auf Vinervin hin (BUDZIKIEWICZ 1963), das zu ersten Mal aus Vinca erecta isoliert (ABDURAKHIMOVA et al. 1964) und dessen Struktur von YAGUDAEV (1974) aufgeklärt wurde. Eine Acetylierung mit Acetanhydrid/Pyridin führte zu einer weniger polaren Verbindung mit einem Molekulargewicht von 380 m/z (Monoacetat) und dem für die Akuammicingruppe typischen Fragment 121 m/z. Durch Co-Chromatographie mit authentischem Vinervin und Sewarin (10-Hydroxyakuammicin) konnte eindeutig das zum Strychnos-Typ gehörende Vinervin (12-Hydroxyakuammicin) identifiziert werden.



Bande 2 mit einem Rf-Wert von 0,23 konnte im FM 1 gereinigt werden (Rf-Wert 0,4). Die Substanz zeigt eine grüne Cer-Färbung und das übliche UV-Spektrum eines Indols mit den Maxima bei 292, 284 und 226 nm. Das Molekulargewicht liegt bei 354. Die Acetylierung bringt einen um 42 Masseneinheiten höheren Molekularpeak, woraus man wiederum das Vorhandensein einer Hydroxylgruppe ableiten kann.

Durch massenspektroskopischen Vergleich konnte eindeutig gezeigt werden, daß bei der vorliegenden Verbindung die OH-Gruppe nicht am Indolkern substituiert ist. Es handelt sich um ein an der Seitenkette

hydroxyliertes Iboga-Alkaloid.

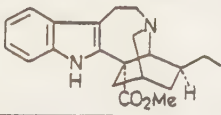
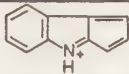
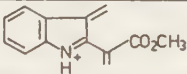
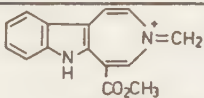
Fragmente	Masse		19-OH-Coronaridin
	154	+	+
	195	+	+
	214	+	+
	253	+	+
$M^+ - \text{-CH(OH)-CH}_3$	-45	-	+
$M^+ - \text{-CH}_2\text{-CH}_3$	-29	+	-
$M^+ - \text{-CH}_3$	-15	+	+
M^+		338	354

Tabelle 5: massenspektroskopische Fragmente von Coronaridin und 19-OH-Coronaridin isoliert aus *Tabernaemontana divaricata*

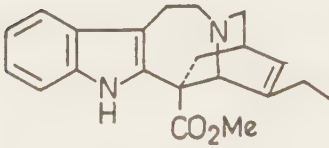
Zwei Aspekte sind für die Identifizierung hauptsächlich entscheidend:

- Die Fragmente im Bereich zwischen 154 und 253 m/z, die von dem Indolkern des Alkaloids stammen, stimmen mit denen von Coronaridin überein. Daher kann am Indolteil keine Hydroxylgruppe substituiert sein.
- Es fehlt das Fragment $M^+ - 29$ (325 m/z), das durch die Abspaltung der Ethylseitenkette entsteht. Statt dessen ist ein Fragment $M^+ - 45$ vorhanden, das wie in Tabelle 5 beschrieben, nur von der Gruppierung

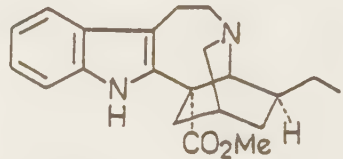
-CH(OH)-CH₃ stammen kann.

3.3.1.1. Zur Stereochemie der Iboga-Alkaloide

Bei den Alkaloiden des Iboga-Typs existieren zwei Antipoden, deren eine durch Catharanthin und die andere durch Coronaridin repräsentiert wird :



Catharanthin



Coronaridin

Eine Unterscheidung dieser beider Strukturen kann mit Hilfe der CD-Kurven getroffen werden. Catharanthin zeigt drei Gruppen von Cotton-Effekten : ein Triplett von teilweise überlappenden positiven Banden in dem Bereich zwischen 270 und 295 nm, ein weiteres Triplett von negativen Banden zwischen 240 und 250 nm und bei 215 nm eine positive Bande.

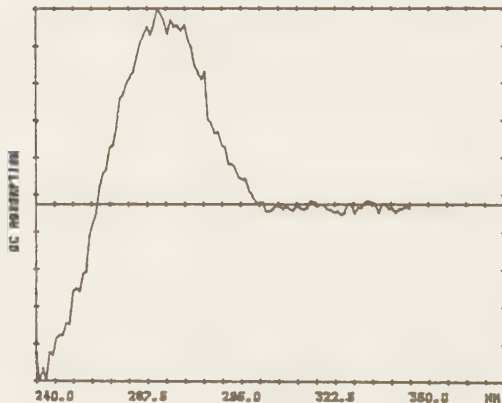


Abb. 14: CD-Kurve von Catharanthin aufgenommen in Methanol als Lösungsmittel

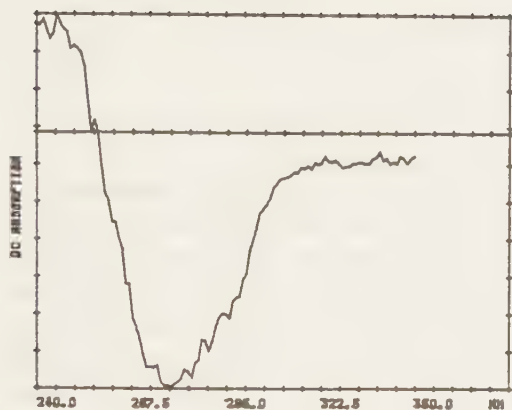
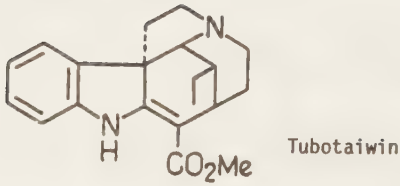


Abb. 15: CD-Kurve von 19-OH-Coronaridin aufgenommen in Methanol als Lösungsmittel

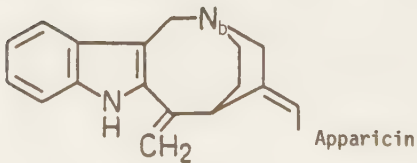
Coronaridin zeigt die gleichen Effekte, allerdings mit jeweils anderem Vorzeichen (CORDELL 1981). Auf diese Weise konnte 19-OH-Coronaridin eindeutig identifiziert werden. Die Stellung der OH-Gruppe kann nur durch NMR-Spektroskopie bestimmt werden.

Bande 4 mit einem Rf-Wert von 0,6 wurde im FM 12 rechromatographiert. Mit einem Rf-Wert von 0,15 konnte eine Substanz eluiert werden, die auf der DC-Platte mit Cer-Reagenz eine intensive blaue Färbung ergibt. Das UV-Spektrum mit den Maxima bei 328, 298, 232 und 204 nm deutet auf einen B-Anilin-Acrylat-Chromophor hin, wie man ihn bei Alkaloiden vom Aspidosperma- und Strychnos-Typ findet. Das gut strukturierte Massenspektrum zeigt den Molekularpeak bei 324 m/z. Durch Vergleich der vorliegenden Daten und Bestimmung der optischen Drehung konnte das schon oben beschriebene Tubotaiwin (III 1.) identifiziert werden.



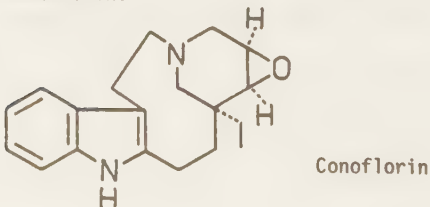
Bande 5 hat einen R_f-Wert von 0,7. Nach nochmaliger Chromatographie im FM 12 wurde eine Substanz mit grauer Cer-Färbung isoliert (R_f-Wert 0,25). Das UV-Spektrum mit den Maxima bei 312 (Schulter), 303 und 230 nm ist dem von Ulein sehr ähnlich, doch hat die hier gefundene Substanz einen um zwei Masseneinheiten niedrigeren Molekularpeak. Die Verbindung konnte als Apparicin identifiziert werden. Sowohl Ulein, als auch Apparicin zeichnen sich durch das Fehlen eines C-Atoms zwischen dem Indolkern und dem Stickstoff (N_b) aus. Biosynthetisch leiten sie sich aber trotzdem vom Tryptamin ab.

Apparicin ist bei den Apocynaceae ein weit verbreitetes Alkaloid.



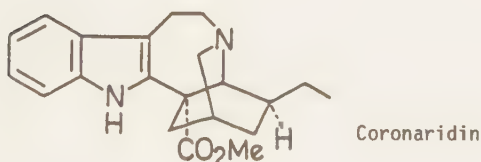
Bande 6 mit einem R_f-Wert von 0,9 ist die am wenigsten polare Fraktion. Bei der Reinigung im FM 6 konnten zwei Verbindungen voneinander getrennt werden.

Die Substanz mit dem kleineren R_f-Wert hat eine rote Cer-Färbung und konnte auf Grund des UV- und Massenspektrums eindeutig identifiziert werden. Es handelt sich um das schon bei Tabernanthe iboga isolierte Conoflorin.

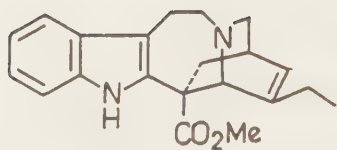


Die zweite Bande mit dem Rf-Wert von 0,48 wurde nochmals im FM 12 und FM 7 chromatographiert. Es wurden zwei Substanzen von unterschiedlicher Konzentration getrennt.

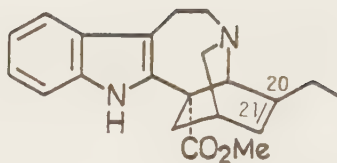
Die Verbindung, die in höherer Konzentration vorhanden war, zeigt eine deutliche grüne Färbung mit Cer, ein typisches Indol-UV-Spektrum mit den $\lambda_{\max}$ bei 292, 284 und 226 nm, das Molekulargewicht beträgt 338. Das Fragmentierungsschema mit den Bruchstücken bei 154, 195, 214, 253 und 309 m/z deutet auf das Iboga-Alkaloid Coronaridin hin, das erstmals in Tabernaemontana coronaria gefunden wurde (GORMANN et al. 1960). Eine genaue Charakterisierung konnte durch Bestimmung des Drehwertes und durch Co-Chromatographie erzielt werden. Auf Grund der geringen Polarität war es möglich eine GC-MS-Analyse durchzuführen. Dabei zeigte Coronaridin eine Retentionszeit von 4,5 min, die noch vorhandenen Verunreinigungen sind vernachlässigbar (vergl. II 6.3.). Im Folgenden wurde durch den Einsatz der HPLC-Analytik das Verfahren zur Bestimmung der Reinheit einer Probe wesentlich vereinfacht.



Das in geringerer Konzentration vorkommende Alkaloid mit einer ockerfarbenen Cer-Färbung zeigt ebenfalls das, für den Indolchromophor typische UV-Spektrum. Das Molekulargewicht beträgt 336 und das Fragmentierungsmuster spricht für das Iboga-Alkaloid Catharanthin, das zuerst aus Catharanthus roseus isoliert wurde (GORMANN et al. 1959). Die isolierte Menge lag unter 10 µg, aus diesem Grund war eine weitere stereochemische Untersuchung dieses Produktes nicht möglich. Es war aber nicht auszuschließen, daß es sich hier um das bis jetzt noch nicht beschriebene 20,21-Dehydrocoronaridin handeln könnte.



Catharanthin



20,21-Dehydrocoronaridin

Die ebenfalls eluierte Bande 3 wurde bis jetzt noch nicht näher behandelt, da hier zwei Substanzen gefunden wurden, die strukturell noch nicht aufgeklärt werden konnten. Beide Verbindungen, die sich im FM 3 sehr gut auftrennen ließen, haben ein Molekulargewicht, das weit über das eines monomeren Indolalkaloids hinausgeht. Auf Grund

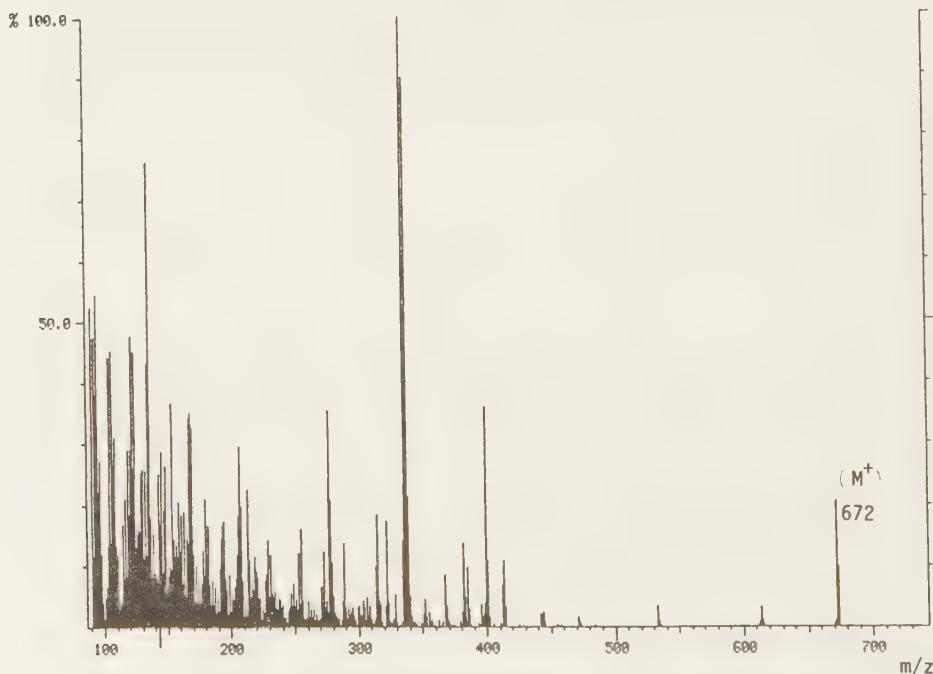


Abb. 16 : Unbekanntes dimeres Indolalkaloid aus Tabernaemontana divaricata

der massenspektroskopischen Untersuchungen kann man aber feststellen, daß beide Verbindungen aus zwei monomeren Bestandteilen aufgebaut sind. Es handelt sich also um dimere Alkaloide bzw. Bisindolalkaloide. Das erste Dimere mit einer rotbraunen Cer-Färbung und einem UV-Spektrum mit den Maxima bei 281, 279 und 214 nm hat ein Molekulargewicht von 668. Das Massenspektrum zeigt aber nur eine schwache Strukturierung und ist aus diesem Grunde nur wenig aussagekräftig.

Bei dem zweiten Alkaloid mit dem Molekularpeak bei 672 m/z kann man mit einiger Sicherheit sagen, daß das Molekül aus zwei gleichen Hälften aufgebaut ist. Der Basispeak liegt bei 336 M/z, was genau der Hälfte des Gesamt-moleküls entspricht. Die Verbindung zeigt eine ockerfarbene Cer-Färbung, im UV-Spektrum sind die Maxima bei 293, 284 und 225 zu erkennen (vergl. Abb. 16).

Verbindung	Identifizierung	Cer-Färbung	isolierte Menge (µg)	Alkaloid-Typ
Vinervin	UV, EI-MS, Acetylierung, Co-Chr., $[\alpha]_D^{20}$	rötlich	4,7	S
10-OH-Coronaridin	UV, EI-MS, CI-MS, DCI-MS, Acetylierung, CD	grün	kein Wert	I
Tubotaiwin	UV, EI-MS, CI-MS, Co-Chr., $[\alpha]_D^{20}$	blau	10,0	S
Apparicin	UV, EI-MS, Co-Chr., $[\alpha]_D^{20}$	grau	2,5	Ap
Conoflorin	UV, EI-MS, CI-MS, DCI-MS, Co-Chr., $[\alpha]_D^{20}$	rot	3,9	A
Catharanthin *	UV, EI-MS	ocker	kein Wert	I
Coronaridin	UV, EI-MS, GC-MS, $[\alpha]_D^{20}$	grün	10,4	I

Tabelle 6 : Isolierte Verbindungen aus *Tabernaemontana divaricata*

(A=Aspidosperma-, Ap=Apparicin-, I=Iboga und S=Strychnos-Typ-Alkaloid)

* oder 20,21-Dehydrocoronaridin

4. Alkaloide aus Ochrosia elliptica Labill.

4.1. Beschreibung der Pflanze

Ochrosia elliptica Labill. (= Bleekeria elliptica (Labill.) Koidz. oder Excavatia elliptica (Labill.) Mgf.) ist ein kleiner tropischer immergrüner Baum, der innerhalb der Plumerioideae zusammen mit Rauwolfia und Kopsia in den Tribus der Rauwolfieae gehört.

Fünfehn Ochrosia-Arten wurden bis jetzt beschrieben, die in Australien, Madagaskar, auf Hawaii und anderen pazifischen Inseln vorkommen. Ochrosia elliptica wurde zuerst 1824 in Neu Caledonien beschrieben. Erste chemische Untersuchungen (GRESHOFF 1890) zeigten, daß die Rinde reich an Alkaloiden ist, wobei allerdings nur Farbe und Löslichkeit ein Unterscheidungsmerkmal war.

Bis jetzt wurden die Alkaloide Ellipticin, Isoreserpilin, Methoxyellipticin gefunden (GOODWIN et al. 1959). Ellipticin und Methoxyellipticin haben eine zytotoxische Aktivität. Es war somit interessant zu untersuchen, ob auch von der Zellkultur diese Substanzen gebildet werden.

4.2. Beschreibung der Zellkultur

Der Kallus wurde aus Blättern von Ochrosia elliptica Labill. angelegt. Der hellbraune Kallus wächst auf DAX Medium sehr gut, daher wurde dieses Medium auch für die Suspensionskultur übernommen.

Pro Liter Medium konnten 280 g Zellmasse (Frischgewicht) abgeerntet werden. Das Trockengewicht betrug 4,7 %. Für die Alkaloidaufarbeitung wurden 2 kg Gewebe verwendet.

4.3. Aufarbeitung des Gewebes

Für die Extraktion der Alkaloide wurden 1,5 kg O. elliptica Gewebe (entspricht 76,5 g Trockengewicht) mit 2 Liter Essigester und beim zweiten Mal mit einer Mischung aus 95 Teilen Essigester und 5 Teilen Methanol im Kühlraum bei +5°C gerührt. Die organischen Phasen wurden wie unter II 7. beschrieben aufgearbeitet. Der erhaltene Chloroform-

extrakt wurde auf 10 ml eingengt und mit Hilfe der Säulenchromatographie aufgetrennt.

4.3.1. Säulenchromatographie

Zur Trennung großer Alkaloidmengen hat sich besonders die Säulenchromatographie mit Kieselgel bewährt, da es hier möglich ist Mengen im 100 mg Bereich in relativ kurzer Zeit zu trennen.

Als Laufmittelsystem wurde FM 1 gewählt, das sich bei Vorversuchen auf Dünnschichtplatten als gut erwiesen hat (vergl. II 5.2.).

Es wurden insgesamt 90 Fraktionen von 13,5 ml aufgefangen, die dann zu 5 unterschiedlichen Banden zusammengefaßt wurden.

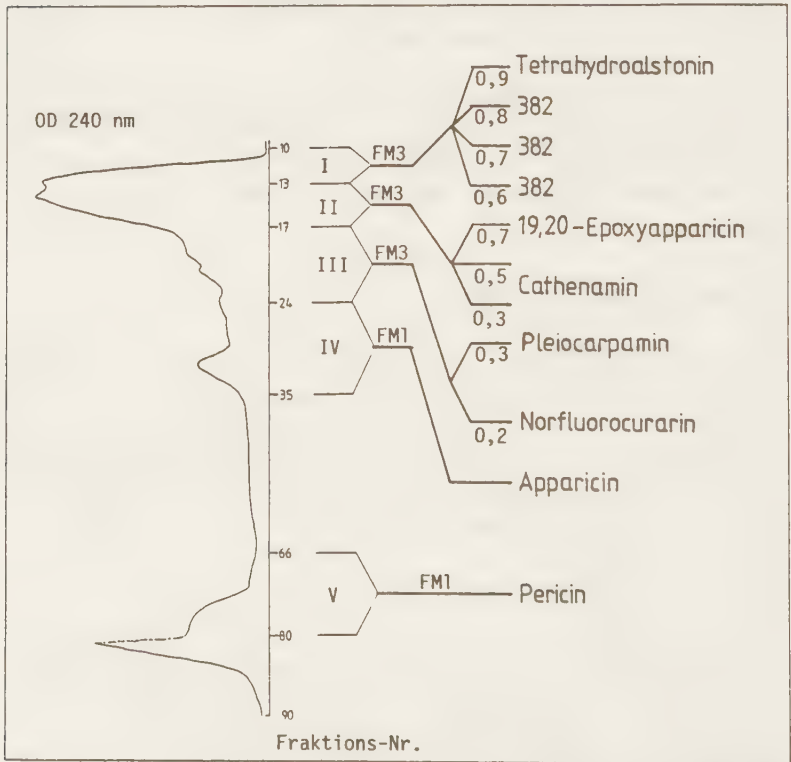
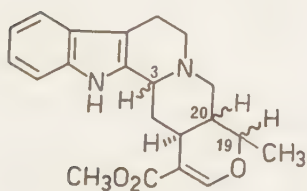


Abb. 17 : Hauptalkaloide aus *Ochrosia elliptica*. Elutionsprofil mit Banden I - V.
Die Zahlen geben die jeweiligen Rf-Werte an.

4.3.2. Alkaloidisolierung und Identifizierung

Die Fraktionen 10-13 stellen die am wenigsten polare Bande I dar. Im darauffolgenden Reinigungsschritt im FM 3 konnten 4 Substanzen voneinander abgetrennt werden. Die höchste Konzentration wies eine Verbindung mit dem Rf-Wert von 0,9 auf. Mit Cer-sulfat war eine gelbbraune Färbung zu sehen. Das UV-Spektrum mit den Maxima bei 292, 280, 272 und 227 läßt noch keine spezifische Zuordnung zu. Massenspektroskopisch ist der Molekularpeak bei 352 m/z zu erkennen gewesen, besonders auffällig ist aber der sehr intensive M^+-1 Peak, der typisch für Derivate des Heteroyohimban- bzw. Corynanthe-Typs ist. Die weiteren Signale bei 159, 169, 170, 184 und 337 (M^+-15) m/z findet man in dieser Form alle bei der Raubasingruppe, die sich nur durch die Stereochemie unterscheiden.

Raubasingruppe	C3H	C19H	C20H
Ajmalicin=Raubasin	α	β	β
Akuammigin	β	α	β
19-Epi-ajmalicin	α	α	β
Isoajmalicin	β	β	β
3-Iso-19-epiajmalicin	β	α	α
Rauniticin	α	α	α
Tetrahydroalstonin	α	β	α



Die Massenspektren dieser Stereoisomeren zeigen signifikante Unterschiede, sowohl in den Intensitäten, wie auch bei der Lage der Signale (HESSE 1979) :

1. Der Peak 184 m/z ist beim Ajmalicin wesentlich höher als beim Tetrahydroalstonin (Ajmalicin 184 (60%), Tetrahydroalstonin 184 (15%)).
2. Der Ajmalicinpeak 225 m/z ist im Spektrum von Tetrahydroalstonin nicht vorhanden, anstelle dessen erscheint ein Signal vergleichbarer Intensität bei 223 m/z.
3. Es gibt Intensitätsunterschiede bei Signal 337 m/z (beispielsweise Ajmalicin 337 (7%), Tetrahydroalstonin (34%)).

Durch Vergleich der massenspektroskopischen Daten konnte mit Sicherheit angenommen werden, daß es sich hier um Tetrahydroalstonin handelt. Auch bei der Co-Chromatographie der isolierten Substanz und allen Stereoisomeren im FM 3 zeigt sich ein übereinstimmendes Laufverhalten mit Tetrahydroalstonin.

4.3.2.1. HPLC - Trennsystem

Um zusätzlich zu der dünnsschichtchromatographischen Identifizierung noch eine weitere Zuordnungsmöglichkeit zu haben, wurde ein HPLC-Trennsystem entwickelt, bei dem die Retentionszeiten der einzelnen Alkaloide weit genug auseinander lagen.

Als mobile Phase wurde ein Acetonitril/Wasser (10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) Gemisch verwendet, dessen Zusammensetzung sich linear mit der Zeit ändert.

Säule	Hibar Lichro Cart RP 18 (0,4 x 25 cm)
Fließmittel	Acetonitril/Wasser
Gradient	25 : 75 in 40 min linear auf 99 : 1
Flußrate	1 ml / min
Detektion	280 nm / range 0,04

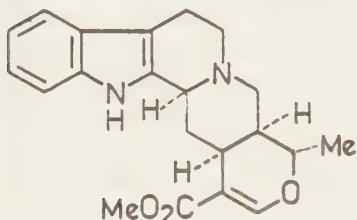
Durch die Auswahl des Gradienten war es möglich die Verweildauer der Alkaloide auf der Säule so zu verlängern, daß auch bei der Verwendung von Alkaloidrohextrakten die zu analysierenden Peaks nicht unter der oft sehr breiten Frontbande verschwanden.

Die Retentionszeiten betrugen :

Ajmalicin	23,03 min
Akuammigin	25,40 min
19-Epi-ajmalicin	23,80 min

Isoajmalicin	29,78 min
3-Iso-19-epi-ajmalicin	30,94 min
Rauniticin	34,62 min
Tetrahydroalstonin	26,72 min

Durch die Zugabe der einzelnen Alkaloide als interner Standard zu den Extrakten konnte eindeutig Tetrahydroalstonin nachgewiesen werden.



Tetrahydroalstonin

Die weiteren Substanzen aus Bande I mit den Rf-Werten : 0,8; 0,7; und 0,6 zeigen alle eine gelbe Cer-Färbung, das gleiche UV-Spektrum wie Tetrahydroalstonin, allerdings einen um 30 Masseneinheiten höheren Molekularpeak bei 382 m/z. Auffallend ist das Auftreten der Fragmente 186, 199 und 214 m/z, die eine deutliche Korrelation mit den Fragmenten der Raubasingruppe aufweisen :

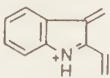
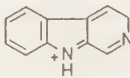
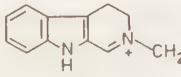
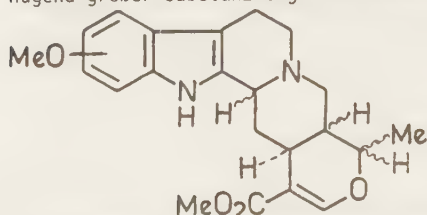
Raubasingruppe	Substanzen mit dem MG 382
 156 m/z $\longrightarrow$	186 m/z
 169 m/z $\longrightarrow$	199 m/z
 184 m/z $\longrightarrow$	214 m/z

Tabelle 7 : Massenspektroskopische Fragmente der Raubasingruppe im Vergleich mit denen der isolierten Verbindungen.

Wie aus Tabelle 7 ersichtlich, sind die Fragmente um jeweils 30 Massen-

einheiten größer. Damit ist sicher, daß sich am Indolkern eine Methoxygruppe befindet. Die Addition der Methoxygruppe kann an 4 Stellen des Indolkerns erfolgen und wie oben erwähnt existieren jeweils 7 unterschiedliche Stereoisomere. Eine genaue Zuordnung wäre bei genügend großer Substanzmenge nur mit Hilfe der NMR-Methode möglich.



Die Fraktionen 14 - 17 wurden zu der Bande II zusammengefaßt. Im FM3 konnten 3 Verbindungen mit unterschiedlicher Konzentration isoliert werden.

Zwei Verbindungen mit den Rf-Werten von 0,3 und 0,6 zeigten nach Besprühen mit Cer-sulfat eine gelbliche Färbung und unter der UV-Lampe eine intensiv blaue Fluoreszenz. Die UV-Spektren mit den Maxima bei 289, 280, 275 und 220 nm erlaubten noch keine exakte Zuordnung. Das Massenspektrum zeigt den Molekularpeak bei 350 m/z und wiederum die Signale bei 156, 169 und 170 m/z, die typisch für den Heteroyohimbin-Typ sind. Durch Co-Chromatographie konnte Cathenamin identifiziert werden, doch ist diese Methode auf Grund der Instabilität dieser Verbindung zu einer eindeutigen Bestimmung nicht geeignet. Der einzig mögliche Weg ist, die Substanz durch Reduktion mit NaBH_4 in eine stabile Form zu überführen, die dann eine Identifizierung ermöglicht. Cathenamin kann in zwei Formen vorliegen (HEMSCHIEDT 1983), die nach Reduktion zu drei isomeren Verbindungen führt :

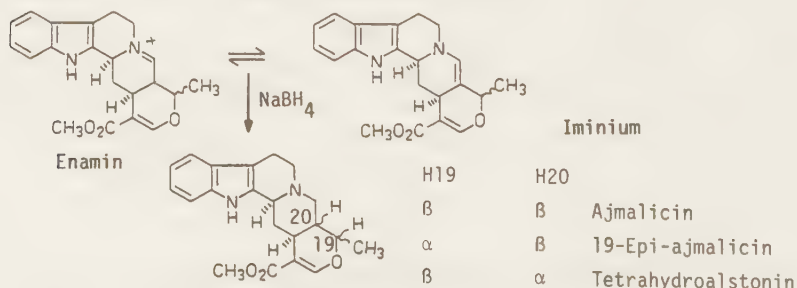


Abb.18 : Reduktion von Cathenamin

Diese 3 Isomeren können mit Hilfe der HPLC-Methode nach dem oben beschriebenen Verfahren getrennt werden. Dabei wurden Tetrahydroalstonin und 19-Epi-ajmalicin nachgewiesen.

Das Hauptprodukt der zweiten Bande mit einem R_f -Wert von 0,7 zeigt mit Cer-sulfat eine erst violette, dann graue Färbung. Das UV-Spektrum entspricht vollständig dem des Apparicins. Beide Verbindungen unterscheiden sich allerdings durch das Molekulargewicht: während Apparicin ein Molekulargewicht von 264 besitzt, zeigt die bisher in der Literatur nicht beschriebene Substanz den Molekularpeak bei 280 m/z. Die Fragmentierungsmuster stimmen in weiten Bereichen überein. Auffallend ist bei der neuen Substanz nur das Fehlen der Abspaltung einer Ethylgruppe, während ein M^+-CH_3 Bruchstück (265 m/z) vorhanden ist.

Eine NMR-spektroskopische Untersuchung mußte nun klären, inwieweit zwischen der neuen Substanz und dem Apparicin Übereinstimmungen vorhanden sind und welche Unterschiede feststellbar sind. In Abb. 19 ist das Apparicin mit den 1H -NMR-spektroskopischen Daten dargestellt.

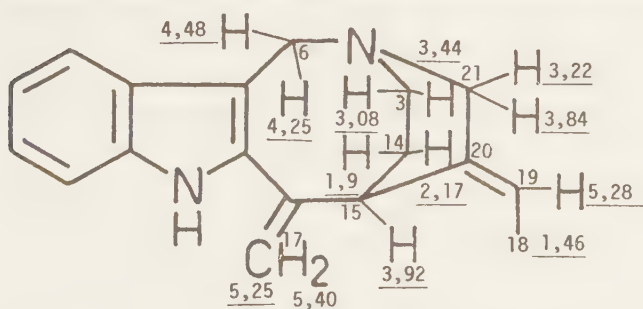


Abb. 19 : Apparicin, 1H -NMR-spektroskopische Daten
die unterstrichenen Zahlen geben die chemische Verschiebung (δ) an (nach JOULE et al. 1962a).

In den Abbildungen 20 und 21 sind die NMR-Spektren von Apparicin und der neuen Substanz übereinander angeordnet zu sehen. Bei dem Vergleich beider Spektren erkennt man eine Übereinstimmung in dem breiten Signal für das am Indolstickstoff gebundene Proton (7,93 ppm) und bei dem aromatischen Bereich zwischen 7,39 und 6,86 ppm. Weiterhin bei den sehr intensiven Singulets der Methylengruppe (H₂-C17; 5,40; 5,25 ppm), die auf Grund der sp^2 -Hybridisierung nur eine kleine geminale Kopplung aufweisen (< 1 Hz). Übereinstimmende Signale findet man auch

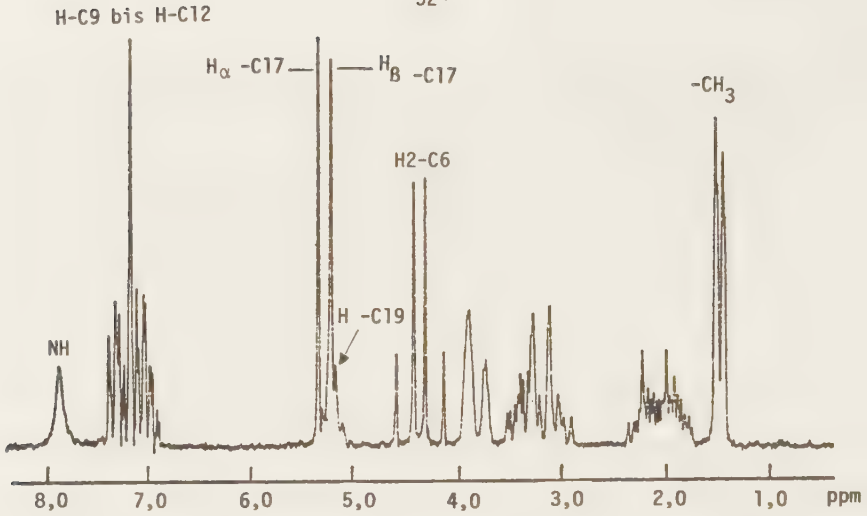


Abb. 20 : ^1H -100 MHz-NMR-Spektrum von Apparicin (aus JOULE et al. 1965a)

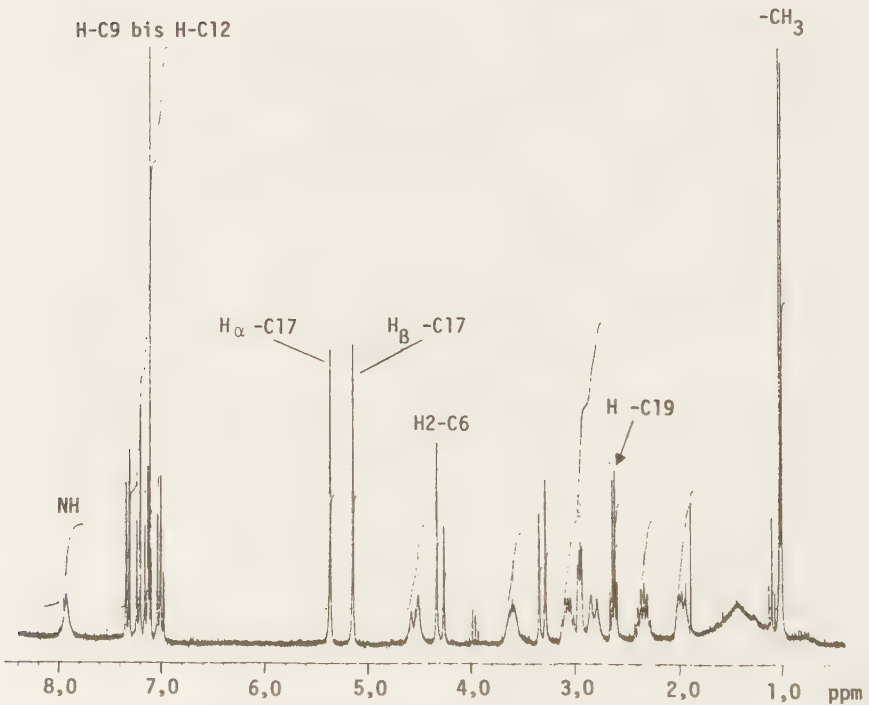


Abb. 21 : ^1H -300 MHz-NMR-Spektrum der neuen Substanz
isoliert aus Ochrosia elliptica

bei den Resonanzen der Protonen an C6 (4,48 und 4,24 ppm) mit der großen Kopplungskonstanten von 17 Hz.

Zum höheren Feld hin folgt ein sehr unübersichtlicher Teil zwischen 4,0 und 1,0 ppm, in dem die Resonanzen des Piperidin-Ringsystems auftreten.

Im Vergleich zum Apparicin ist in dem Spektrum der unbekannten Substanz besonders das Fehlen des breiten Quartetts bei 5,28 ppm auffallend, das für H-C19 charakteristisch ist. Bei der isolierten Substanz kann an C19 aber nur ein Proton gebunden sein, da die Resonanz der Methylgruppe nur in ein Dublett aufgespalten wird. Interessanterweise liegt dieses Dublett bei 1,0 und nicht wie beim Apparicin bei 1,46 ppm. Zusätzlich fehlt auch noch die Feinaufspaltung durch das H_{α} -C21.

Damit scheint sicher zu sein, daß die Ethylenseitenkette eine andere Struktur aufweist, als das beim Apparicin der Fall ist.

Eine wesentliche Erleichterung bei der Interpretation eines solchen Spektrums stellt die zweidimensionale NMR-Technik dar (vergl. II 6.4.). Das COSY-Spektrum (siehe Abb. 22 und 23) zeigt auf der Diagonalen das normale eindimensionale NMR-Spektrum als Kontur- oder Höhenlinien-diagramm. Alle Peaks, die außerhalb dieser Diagonalen liegen, sind die sogenannten Cross- oder Kreuz-Peaks, die eine homonucleare 1H - 1H -Kopplung anzeigen.

Wie bei der Diskussion des eindimensionalen Spektrums läßt sich auch hier bei 7,93 ppm das am Indolstickstoff gebundene Proton finden. Der Peak ist nur schwach zu erkennen, da die Schnittebene so gewählt wurde, daß kleine Peaks gerade noch nachweisbar sind, das Grundrauschen aber nicht erscheint.

Darauffolgend findet man die aromatischen Protonen mit dem typischen Kopplungsmuster. Bei 5,40 und 5,24 ppm erkennt man die Protonen an C17 mit kleiner Kopplung (< 1 Hz). Hier wird nochmals deutlich, daß das Signal von H-C19 fehlt, da sonst ein intensiver Cross-Peak mit H3-C18 feststellbar gewesen wäre.

Für die Interpretation des restlichen aliphatischen Teils im Bereich zwischen 4,0 und 1,0 ppm wurde eine Ausschnittsvergrößerung erstellt. Wie in Abb. 23 zu erkennen ist, sind alle Cross-Peaks durch gepunktete Linien mit dem jeweiligen Kopplungspartner verbunden worden.

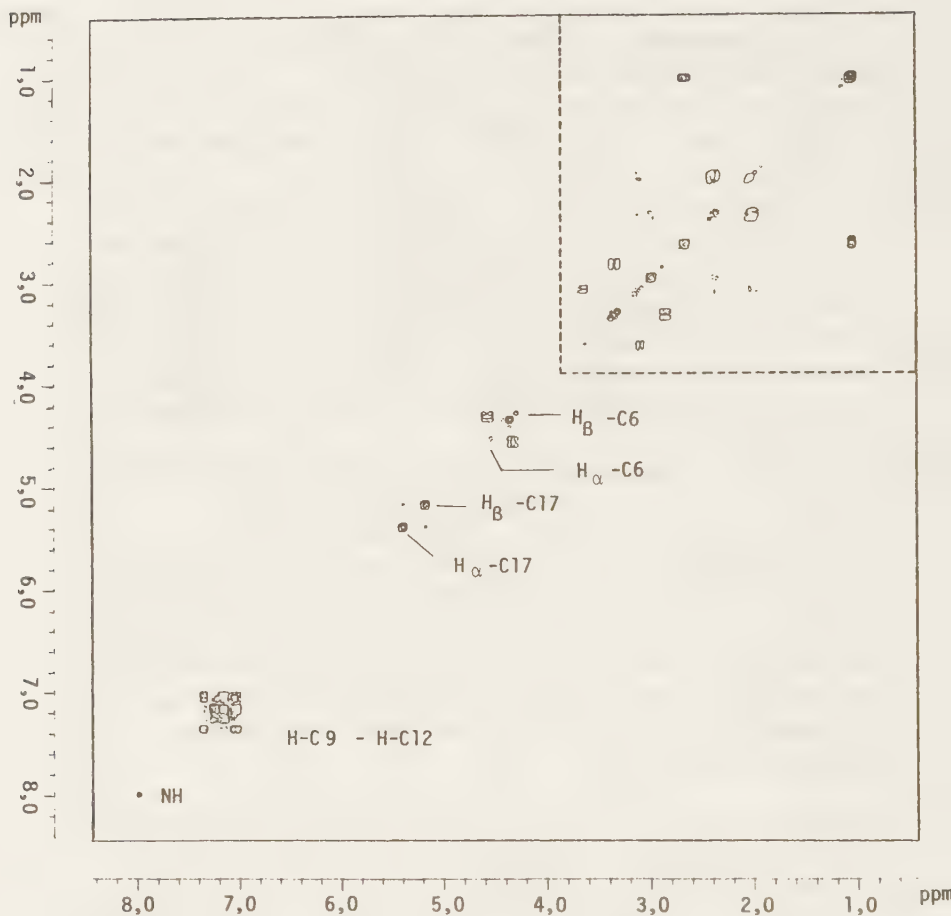


Abb. 22: 2-D-NMR-Spektrum der unbekannten Substanz

Der teilweise mit gestrichelter Linie umrandete Bereich wird in Abb.23 als Ausschnittsvergrößerung dargestellt.

Betrachtet man die Methylgruppe (H_3-C18) bei 1,0 ppm, so kann man einen Kreuz-Peak mit dem Signal bei 2,60 ppm erkennen, das im ein-dimensionalen Spektrum eine Aufspaltung zu einem Quartett zeigt. Es handelt sich also um das Proton an C19. Die Lage des Signals spricht gegen eine Doppelbindung zwischen C19 und C20 wie es beim Apparicin der Fall ist (hier liegt $H-C19$ bei 5,28 ppm).

Es muß aber an dieser Stelle ein Substituent sein der einen Doppel-

bindungscharakter hat, denn :

- H-C19 entspricht nach der Integration nur einem Proton
- an C20 befindet sich kein Proton, denn weder H-C19 noch H-C21 erfahren eine Aufspaltung
- das Fehlen der Feinaufspaltung von H -C19 durch H_α-C21 setzt eine funktionelle Gruppe voraus, die eine long range Kopplung verhindert.

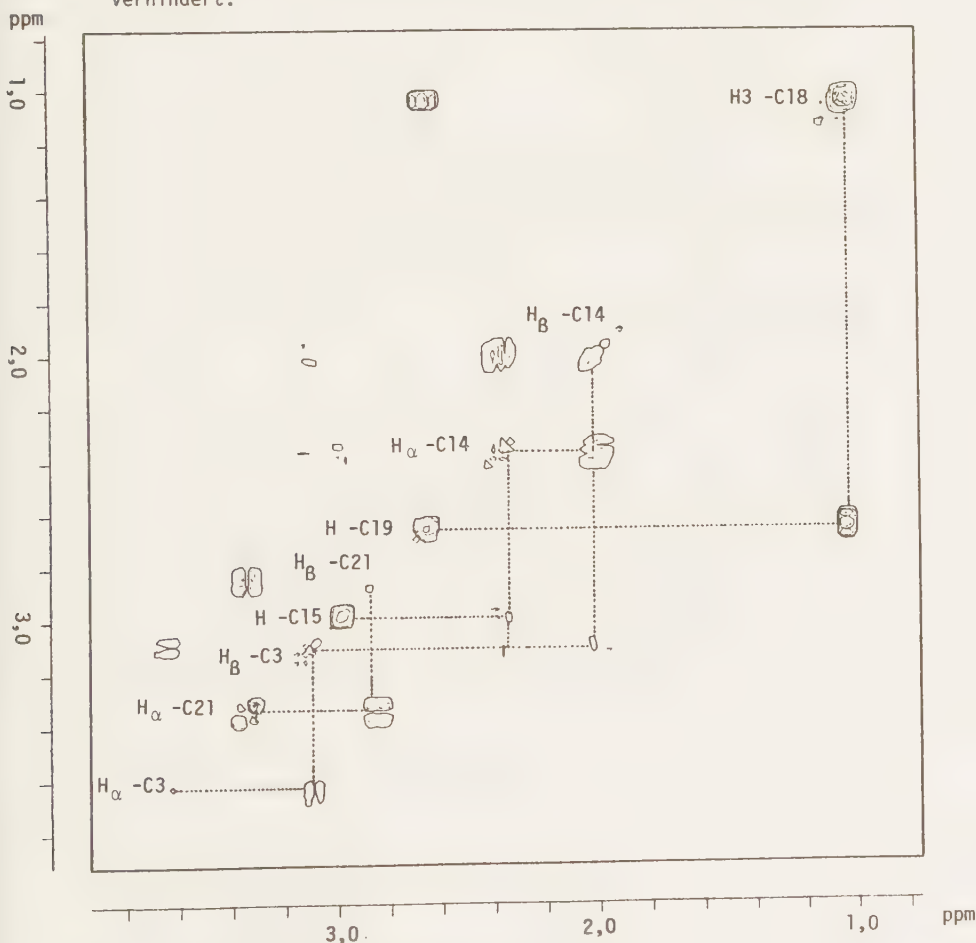
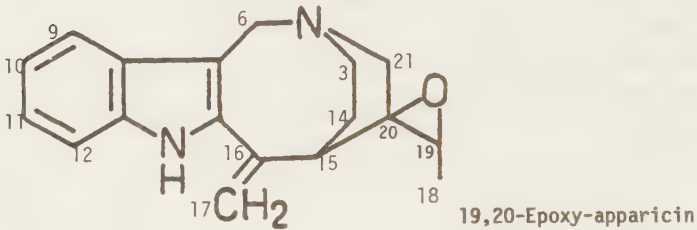


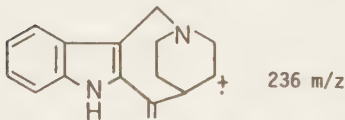
Abb.23 : Ausschnittsvergrößerung aus Abb.22
Die gepunkteten Linien geben die ¹H-¹H-Kopplungen wieder.

Alle diese Fakten sprechen für eine Epoxyfunktion zwischen C19 und C20. Das Alkaloid hätte damit folgende Struktur :



Das läßt sich auch massenspektroskopisch belegen :

Durch die Abspaltung von $-CH_3$ entsteht das Fragment 265 m/z und bei nachfolgendem Herausbrechen der Epoxyfunktion erhält man das Bruchstück 236 m/z :



Auch die weiteren NMR-spektroskopischen Daten passen sehr gut zu der vorgeschlagenen Struktur :

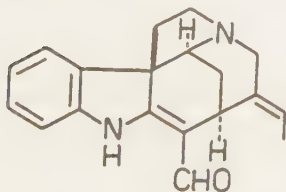
- Die Signale der Protonen an C21 liegen im Vergleich zum Apparicin mit 3,3 und 2,84 ppm im höheren Feld, bedingt durch den geringer entschirmenden Effekt der Epoxygruppe. Das gleiche trifft auch auf H-C15 zu (ganz ähnliche Verhältnisse findet man beim Quaternoxin : MAMATAS-KALAMARAS et al. 1975).
- Die Protonensignale von H_α -C3 und H_β -C3 liegen von der Größenordnung her analog dem Apparicin bei 3,6 und 3,1 ppm.

Protonen	19,20-Epoxyapparicin	10-Methoxy-apparicin
H_α -C3	3,60 (m 14)	3,44 (m 13; 8; 1,5)
H_β -C3	3,10 (m 14)	3,08 (m 13; 11; 6,5)
H_α -C6	4,52 (d, 18)	4,48 (d 17)
H_β -C6	4,30 (d, 18)	4,25 (d 17)
H -C9	7,4 (dd, 8, 1)	
H -C10	6,9 (ddd, 8, 8, 1)	

Protonen	19,20-Epoxyapparicin	10-Methoxy-apparicin
H -C11	7,0 (ddd 8, 8, 1)	
H -C12	7,3 (dd, 8, 1)	
H _α -C14	2,38 (m, 14, 1)	2,17 (m 14; 8; 11; 5)
H _β -C14	2,0 (m, 14)	1,90 (m 14; 6,5; 1,5; 1; 1)
H -C15	3,7 (brs, 1)	3,92 (brs 1)
H _α -C17	5,4 (brs, 1)	5,40 (brs 1)
H _β -C17	5,2 (brs, 1)	5,24 (brs 1)
H3 -C18	1,0 (d, 6)	1,46 (dd 6; 1,5)
H -C19	2,64 (brq, 6)	5,28 (brq 6; 1)
H _α -C21	3,4 (d, 16)	3,84 (brd 16)
H _β -C21	2,9 (d, 16)	3,22 (brd 16)

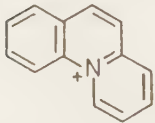
Tabelle 8 : NMR-Daten von dem aus *O. elliptica* isolierten 19,20-Epoxy-apparicin im Vergleich zum 10-Methoxy-apparicin

Die Fraktionen 18-24 wurden zu der Bande III zusammengefaßt. Im FM3 konnten zwei Verbindungen mit den R_f-Werten von 0,2 und 0,3 isoliert werden. Die niedriger laufende Substanz hat eine blaue Cer-Färbung und ein für Indolalkaloide ungewöhnliches UV-Spektrum mit den Maxima bei 360, 299,290 (Schulter) und 242 nm. Bei Zugabe von Alkali erhält man einen starken bathochromen shift ($\lambda_{\max}$ 360 → 387 nm), der beim Neutralisieren reversibel ist. Dies steht im Einklang mit dem erstmals aus *Diplorrhynchos condylocarpon* gefundenen Norfluorocurarin (STAUFFACHER 1961). Ein weiteres Erkennungsmerkmal ist der auffallend hohe optische Drehwert von -1230° in Chloroform. Die massenspektroskopischen Daten mit dem Basispeak bei 121 m/z sind denen des Akuamimicins sehr ähnlich (BUDZIKIEWICZ 1963). Auffällig ist der Peak bei 263 m/z ($M^+ - 29$), der auf den Verlust einer Aldehydgruppe hinweist. Damit konnte das zum Strychnos-Typ gehörende Norfluorocurarin eindeutig identifiziert werden.



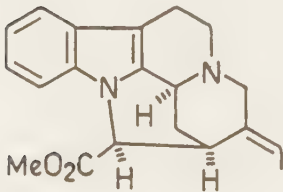
Norfluorocurarin

Die Substanz mit dem R_f -Wert von 0,3 zeigt eine graubraune Cer-Färbung und besitzt einen Indolchromophor, dessen Maxima im UV-Spektrum bei 285 und 230 nm liegen. Im Massenspektrum fällt der sehr intensive Peak des Molekül-Ions bei 322 m/z auf. Zwei weitere Schlüsselbruchstücke sind bei 253 und 180 m/z zu erkennen. Das Bruchstück 263 m/z entspricht dem Verlust einer leicht abspaltbaren $-COOCH_3$ -Gruppe ($M^+ - 59$), das Fragment 180 m/z ist das für die Alkaloide der Pleiocarpamin-Gruppe charakteristische stabile Chinolinium-Ion (HESSE et al. 1964).



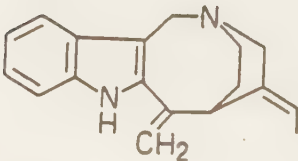
Chinolinium-Ion

Es konnte Pleiocarpamin identifiziert werden.



Pleiocarpamin

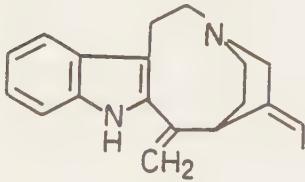
Die Fraktionen 25-35 wurden zur Bande IV zusammengefaßt. Eine Reinigung im FMI erbrachte ein Alkaloid mit grauer Cer-Färbung. Durch Bestimmung des UV-Spektrums, des Massenspektrums und der optischen Drehung konnte das schon unter III 3. beschriebene Apparicin identifiziert werden.



(-)-Apparicin

Die Fraktionen 66-80 ergaben Bande V. Im darauffolgenden Reinigungsschritt im FMI wurde eine Substanz isoliert, die mit Cer-Reagenz eine violette Färbung ergibt. Das UV-Spektrum dieser Verbindung zeigt die

gleichen Maxima wie Apparicin; auch das massenspektroskopische Fragmentierungsmuster ist dem von Apparicin sehr ähnlich, bis auf den Molekularpeak, der hier bei 278 m/z zu finden ist. Es handelt sich um Pericin, eine Substanz, die zum ersten Mal in Picralima nitida gefunden wurde (ARENS et al. 1982). Pericin zeigt eine gute Bindung im Opiat-Rezeptor-Bindungstest und hat eine bemerkenswerte analgetische Wirkung (ARENS et al. 1982).



Pericin

Verbindung	Identifizierung	Cer-Färbung	Alkaloid-Typ
Tetrahydroalstonin	UV, EI-MS, Co-Chr., HPLC	gelb	C
Cathenamin	UV, EI-MS, Co-Chr., HPLC	gelb	C
19,20-Epoxyapparicin	UV, EI-MS, NMR	violett/grau	Ap
Norfluorocararin	UV, EI-MS, Co-Chr., $[\alpha]_D^{20}$	blau	S
Pleiocarpamin	UV, EI-MS, NMR, $[\alpha]_D^{20}$	grau Braun	Pl
Apparicin	UV, EI-MS, Co-Chr.	grau	Ap
Pericin	UV, EI-MS	violett	Ap

Tabelle 9 : Isolierte Verbindungen aus Ochrosia elliptica

(Ap=Apparicin-, C=Corynanthe-, Pl=Pleiocarpamin-, S=Strychnos-Typ)

5. Alkaloide aus Rhazya stricta Decne.

5.1. Beschreibung der Pflanze

Rhazya stricta gehört zusammen mit Catharanthus und Amsonia in den Tribus Alstonieae. Die Gattung Rhazya enthält außer R. stricta nur noch die Art R. orientalis. R. stricta wächst hauptsächlich in den nordwestlichen Regionen von Indien und in Pakistan (HOOKER 1875). Extrakte dieser Pflanze werden in der indischen Volksmedizin bei Halsschmerzen, Fieber, gegen allgemeine Schwächezustände und bei chronischem Rheuma verwendet (CHOPRA et al. 1956). Pharmakologische Untersuchungen zeigten eine zytotoxische Aktivität der Tetrahydrosecamin-Alkaloide und des Vallesiachotamins (MUKHOPADHYAY et al. 1981). Die Suche nach Inhaltsstoffen führte zur Isolierung von über 50 Indolalkaloiden (CORDELL et al. 1970, BROWN et al. 1970, SMITH et al. 1971, CHATTERJEE et al. 1976). Die ebenfalls isolierten Secodin-Typ-Alkaloide sind von besonderem biosynthetischem Interesse (BATTERSBY et al. 1970, SCOTT 1974, WENKERT et al. 1962).

5.2. Beschreibung der Zellkultur

Der Kallus von R. stricta wurde aus gekeimten Samen angelegt. Als Kulturmedium diente das 4X-Medium, das dann auch für die Kultivierung im flüssigen Medium verwendet wurde. Für die Bestimmung des Alkaloidmusters wurden insgesamt 2,5 kg R. stricta-Gewebe gebraucht. Pro Liter Medium konnten ca. 250 g Frischgewicht abgeerntet werden, das entspricht 17,3 g Trockengewicht (= 5,7 %).

5.3. Aufarbeitung des Gewebes

Das R. stricta Gewebe wurde gefriergetrocknet und mit Methanol extrahiert. Die Methanolphasen wurden nach der Filtration eingengt und wie unter II 7. beschrieben aufgearbeitet. Die so erhaltene Chloroformphase wurde mit Hilfe der Säulenchromatographie und der HPLC-Methode aufgetrennt.

5.3.1. Säulenchromatographie

Die auf 10 ml eingeeengte Chloroformphase wurde auf eine mit Kieselgel gepackte Säule aufgetragen (vergl. II 5.2.). Als Laufmittelsystem wurde FM 1 gewählt, mit dem bei Vorversuchen auf Dünnschichtplatten gute Ergebnisse erzielt werden konnten.

Es wurden insgesamt 230 Fraktionen von je 13 ml Volumen aufgefangen, die dann zu 4 unterschiedlichen Banden vereinigt wurden.

Isolierungsschema :

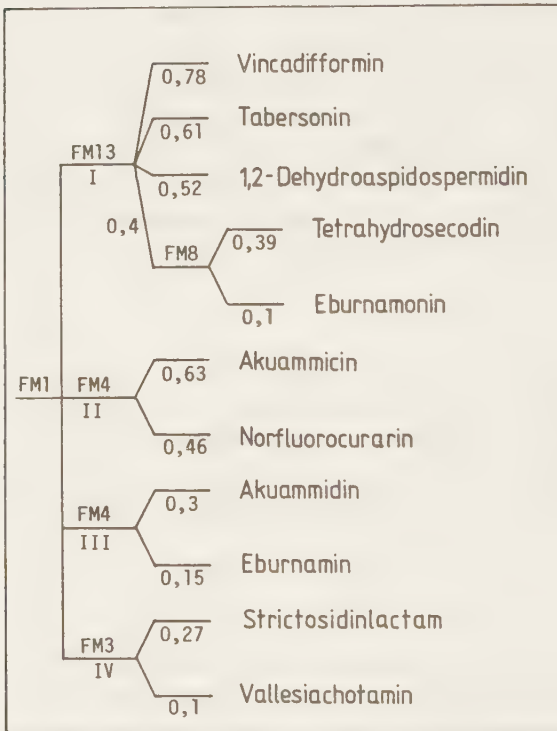


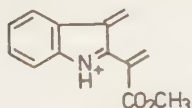
Abb. 24 : Hauptalkaloide aus der Zellsuspensionskultur von Rhazya stricta.

Banden I bis IV von oben nach unten.

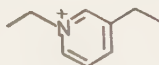
Die Zahlen geben die Rf-Werte in den jeweiligen Fließmittelsystemen an.

5.3.2. Alkaloidisolierungen und Identifizierung

Die Fraktionen 6-16 stellen die am wenigsten polare Bande I dar. Der darauffolgende Reinigungsschritt im FM 13 erbrachte 4 gut voneinander abgetrennte Banden. Die beiden Substanzen mit den größten Rf-Werten (0,78 und 0,61) zeigten bei 366 nm eine blaue Fluoreszenz und ein für den β -Anilinalcrylat-Chromophor typisches UV-Spektrum mit den Maxima bei 328, 298 und 228 nm. Im Massenspektrum der Verbindung mit dem Rf-Wert von 0,78 fallen nur 3 Fragmente auf : der Molekulargewichts-Peak bei 338 m/z (M^+), was durch CI- und DCI-Messungen bestätigt werden konnte. Dann ein Fragment bei 214 m/z und eines bei 124 m/z, wobei das eine für den Indol-, das andere für den aliphatischen Bereich charakteristisch ist.



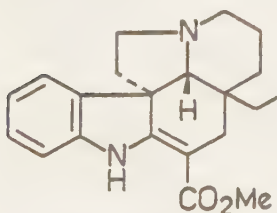
214 m/z



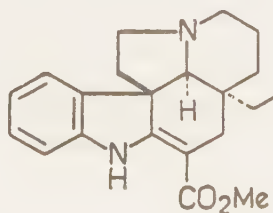
124 m/z

Bei der isolierten Verbindung handelt es sich um das erstmals von DJERASSI et al. (1962) bei Vinca difformis gefundene Aspidosperma-Typ-Alkaloid Vincadifformin. Dieses Alkaloid existiert in zwei stereoisomeren Formen. So konnte in Vinca minor (-)-Vincadifformin nachgewiesen werden, während aus Rhazya stricta, Amsonia tabernaemontana und anderen Pflanzen (+)-Vincadifformin isoliert wurde (SMITH et al. 1963, ZSADON et al. 1970).

In der Suspensionskultur von Rhazya stricta war (+)-Vincadifformin nachweisbar.



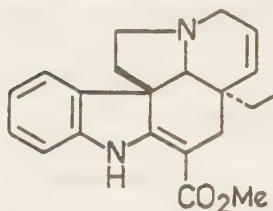
(+)-Vincadifformin



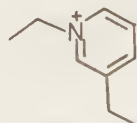
(-)-Vincadifformin

Die zweite Substanz hat im Massenspektrum den Molekularpeak bei 336 m/z. Bei der weiteren Fragmentierung fällt wie bei dem Vincadifformin das Fragment 214 m/z auf. Den Basispeak findet man bei

135 m/z. Dieses Fragmentierungsmuster steht in Übereinstimmung mit dem Aspidosperma-Typ-Alkaloid Tabersonin, ein 14,15-Dehydrovinca-difformin, das zuerst aus Amsonia tabernaemontana isoliert und identifiziert wurde (JANOT et al. 1954).

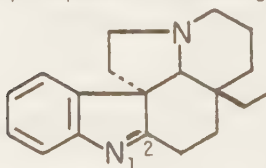


Tabersonin



135 m/z

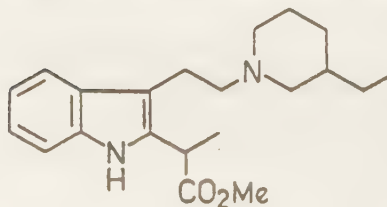
Die dritte Substanz aus Bande I hat eine sehr auffällige orangene Cer-Färbung. Das UV-Spektrum zeigt die Maxima bei 263 und 222 nm. Im Massenspektrum ist der intensive Molekularpeak bei 280 m/z besonders hervorzuheben. Ein weiteres Bruchstück entsteht durch die Abspaltung der Ethylseitenkette : 251 m/z ($M^+ - C_2H_5$). Durch die zusätzliche Bestimmung der optischen Drehung konnte (+)-1,2-Dehydroaspidospermidin eindeutig identifiziert werden.



(+)-1,2-Dehydroaspidospermidin

Die polarste Fraktion aus Bande I wurde nochmals im FM 8 chromatographiert. Dabei ließen sich zwei Substanzen voneinander abtrennen. Die Verbindung mit dem R_f-Wert von 0,39 weist mit Cer-Reagenz erst eine blaue, dann grünliche Färbung und ein für den Indolchromophor charakteristisches UV-Spektrum auf. Im Massenspektrum ist das Fragment 126 m/z am auffälligsten, da es die anderen Peaks im Verhältnis 50 : 1 überragt. Der Molekularpeak liegt bei 342 m/z.

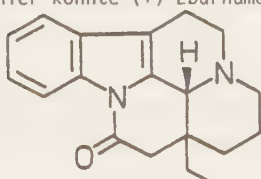
Die genannten Daten stimmen mit dem von CORDELL 1970 aus R. orientalis isolierten Secodin-Typ-Alkaloid Tetrahydrosecodin überein.



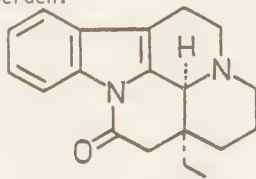
Tetrahydrosecodin

Alkaloide des Secodin-Typs oder von diesem Typ abgeleitete Verbindungen sollen wichtige Intermediate in der Biosynthese monoterpenoider Indolalkaloide sein. Es wird angenommen, daß diese Substanzklasse als reaktiver Acrylsäureester zwischen dem Stemmadenin und den beiden großen Gruppen der Aspidosperma- und Iboga-Alkaloide liegt (SCOTT 1974, vergl. Stemmadenia tomentosa III 6.4.).

Die zweite Substanz hat einen Rf-Wert von 0,1 und eine schwach gelbliche Cer-Färbung. Im UV-Spektrum sind die Maxima bei 302, 296, 268 und 241 nm zu erkennen. Bei massenspektroskopischen Zerfall der vorliegenden Verbindung sind außer dem Molekularpeak bei 294 m/z noch zwei Fragmente für die Identifizierung von großer Bedeutung: das Fragment-Ion 265 m/z entsteht durch die Abspaltung der Ethylseitenkette ($M^+ - 29$) und 237 m/z wird nach dem Herausbrechen einer CO-Gruppierung gebildet ($265 - 28$). Dieses Verhalten stimmt mit dem Eburnamonin überein, ein Alkaloid, das erstmals in Hunteria eburnea gefunden wurde (BARLETT et al. 1963). Wie auch bei dem Vincadifformin existieren zwei stereoisomere Formen: (+)- und (-)-Eburnamonin, die durch Bestimmung der optischen Drehung unterschieden werden können. Hier konnte (+)-Eburnamonin nachgewiesen werden.

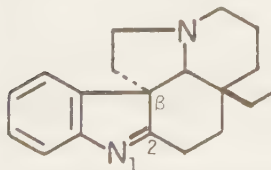


(+)-Eburnamonin

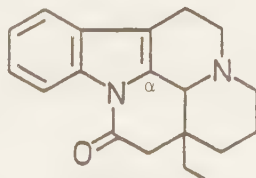


(-)-Eburnamonin

Zwischen dem 1,2-Dehydroaspidospermidin und dem Eburnamonin läßt sich leicht ein struktureller Zusammenhang erkennen.

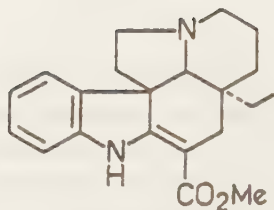


1,2-Dehydroaspidospermidin

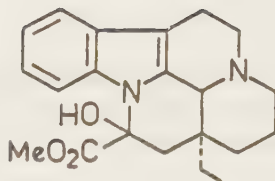


Eburnamonin

Wie schon in der Einleitung ausgeführt, zählt man beide Strukturen zu der Klasse 2, den Aspidosperma-Alkaloiden. Dabei entsteht Eburnamonin durch eine α - und 1,2-Dehydroaspidospermidin durch eine β -Kondensation. Das gleiche gilt für das Paar Vincamin und Vincadifformin.



Vincadifformin



Vincamin

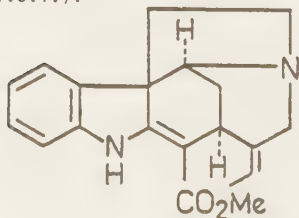
Durch Oxidation ist es möglich Vincadifformin in das Vincamin zu überführen, wozu die unterschiedlichsten Verfahren entwickelt wurden (HUGEL *et al.* 1972, DANIELI *et al.* 1981, CALABI *et al.* 1982). Eburnamin entsteht dann durch die Behandlung von Vincamin mit Acetanhydrid (DALTON 1980).

Über das N-Oxid führt eine Oxidation des 1,2-Dehydroaspidospermidins zum Eburnamonin (HUGEL *et al.* 1974).

Es ist also möglich durch verschiedene Oxidationsverfahren von einem β - zu einem α -Kondensationsprodukt zu gelangen. Damit erscheint es nicht unwahrscheinlich, daß das gemeinsame Vorkommen von (+)-Vincadifformin, (+)-1,2-Dehydroaspidospermidin, (+)-Eburnamonin und Eburnamin (siehe unten) in einem biosynthetischen Zusammenhang steht.

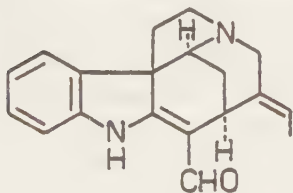
Die Fraktionen 17 bis 35 wurden zu der Bande II zusammengefaßt. Eine nochmalige Chromatographie führte zu zwei gut voneinander abgetrennten Substanzen mit den Rf-Werten von 0,63 und 0,46.

Die weniger polare Verbindung weist ein UV-Spektrum auf, das mit seinen Maxima bei 330, 300 und 227 wiederum typisch für ein Alkaloid des Aspidosperma- und Strychnos-Typs ist. Im Massenspektrum erkennt man den Molekularpeak bei 322 m/z. Die weitere Fragmentierung mit dem Basispeak bei 121 m/z stimmt vollständig mit dem Akuammicin überein (BUDZIKIEWICZ 1963). Durch die zusätzliche Bestimmung der optischen Drehung und Co-Chromatographie mit authentischem Akuammicin konnte dieses Alkaloid identifiziert werden. Im Vergleich zum Condylcarpin liegt hier die Tryptamin-Brücke in β -Stellung vor (vergl. III 1.3.1.).



(-)-Akuammicin

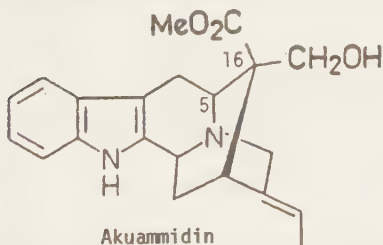
Die polarere Substanz wurde auf Grund des UV-, Massenspektrums, der optischen Drehung und Co-Chromatographie als das schon unter III 4.3.2. beschriebene Norfluorocurarin identifiziert.



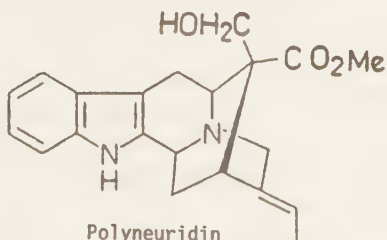
(-)-Norfluorocurarin

Die Fraktionen 36 bis 65 ergaben Bande III.

Auch hier war es nach Rechromatographie möglich zwei Substanzen zu eluieren. Mit einem R_f -Wert von 0,3 wurde ein Alkaloid isoliert, das im UV-Spektrum die Maxima bei 290, 280 und 227 hat. Massenspektroskopisch konnten außer dem Molekularpeak bei 352 m/z noch 4 weitere signifikante Peaks für die Identifizierung herangezogen werden: 321 m/z entsteht durch die Abspaltung einer CH_2OH -Gruppe, 293 m/z durch den Verlust der CO_2CH_3 -Gruppe. Diese Fragmente und die Bruchstücke bei 249 und 169 m/z stimmen mit dem Sarpagin-Typ-Alkaloid Akuammidin bzw. Polyneuridin überein.



Akuammidin



Polyneuridin

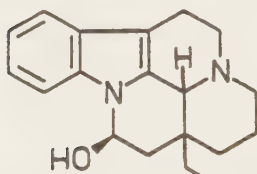
Beide Alkaloide sind Isomere und leiten sich vom Geissoschizin ab (vergl. III 6.4.), in dem die Bindung zwischen C5 und C16 geschlossen wurde. Zur Unterscheidung können die massenspektroskopischen Daten herangezogen werden, denn sie zeigen deutliche Intensitätsunterschiede bei einigen Fragment-Ionen.

Besonders auffällig sind die Unterschiede bei dem Bruchstück $M^+ - H_2O$. Die Wasserabspaltung ist beim Polyneuridin, also bei der Verbindung, deren CH_2OH -Gruppe zum Indolkern weist, wesentlich stärker ausgeprägt als bei Akuammidin (ANTONACCIO et al. 1962, OHASHI et al. 1963). Durch diese Daten und durch Co-Chromatographie konnte eindeutig Akuammidin nachgewiesen werden.

Akuammidin oder auch Rhazin genannt, wurde erstmals aus Rhazya stricta

isoliert (SCHNOSS et al. 1962). Die Substanz, so wird behauptet, soll eine dreimal stärker anästhesierende Wirkung wie Cocain besitzen (CORDELL 1981).

Das zweite Alkaloid mit einem Rf-Wert von 0,15 hat mit Cer-Reagenz eine gelbliche Färbung. Das für den Indolchromophor typische UV-Spektrum kann noch keine Auskunft über das vorliegende Alkaloid geben. Im Massenspektrum erkennt man den Molekularpeak bei 296 m/z als Basispeak. Die weiteren Fragmente 267, 249, 226 und 208 m/z stimmen vollständig mit dem erstmals aus den Blättern von Hunteria eburnea isoliertem Eburnamin überein (BARLETT et al. 1963).



(+)-Eburnamin

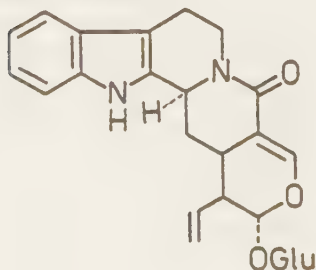
Die Hydroxylgruppe kann sowohl in α - wie auch in β -Stellung vorliegen. Eine Unterscheidungsmöglichkeit besteht durch die Bestimmung der optischen Drehung. Auf diese Weise konnte das hier isolierte Alkaloid als (+)-Eburnamin identifiziert werden.

Die Fraktionen 121 bis 230 ergaben Bande IV.

Bei einer nachfolgenden Chromatographie konnten im FM 3 zwei Substanzen voneinander abgetrennt werden.

Mit einem Rf-Wert von 0,27 wurde eine Verbindung isoliert, die mit Cer-Reagenz eine rötlich-braune Färbung ergibt. Die Maxima im UV-Spektrum liegen bei 291, 281, 273 und 229 nm. Massenspektroskopisch waren die Fragment-Ionen 143, 144, 235, 260 und 336 m/z gut zu sehen. Ein Peak bei 498 m/z wurde als Molekularpeak identifiziert.

Bei dem vorliegenden Alkaloid handelt es sich um das Strictosidinlactam, wie durch Vergleich mit authentischer Substanz bestätigt werden konnte.

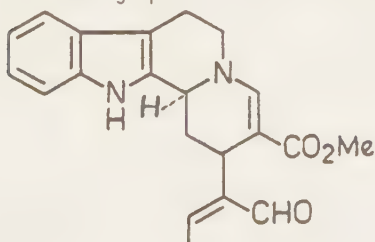


Strictosidinlactam

Strictosidin gehört zu den typischen Alkaloiden der Rhazya Arten (SMITH 1968). Auf Grund der geringen Stabilität in alkalischer Lösung ist es nicht auszuschließen, daß es sich beim Strictosidinlactam um ein Aufarbeitungsartefakt handelt (BATTERSBY et al. 1969). Bei einer HPLC-Untersuchung eines methanolischen Alkaloidrohextraktes konnte Strictosidin allerdings nicht gefunden werden, womit sicher ist, daß hier kein Aufarbeitungsartefakt vorliegt.

Strictosidin, das Kondensationsprodukt von Tryptamin und Secologanin, hat eine herausragende Bedeutung in der Biosynthese der Indolalkaloide monoterpenoiden Ursprungs. Es wird in alle bekannten Grundskelette der Indolalkaloide eingebaut. Strictosidin ist damit das wichtigste Intermediat in der Alkaloidbiosynthese der höheren Pflanzen (STÖCKIGT et al. 1977, ZENK 1980).

Das zweite Alkaloid aus Bande IV zeigt mit Cer-sulfat eine gelbliche Färbung und im UV-Spektrum nur zwei Maxima bei 291 und 220 nm. Im Massenspektrum sind sehr signifikante Peaks zu erkennen : 350 (M^+), 335 ($M^+ - CH_3$), 322 ($M^+ - CO$), 307 ($M^+ - CH_3, -CO$) und 291 ($M^+ - CO_2CH_3$) m/z. Diese Daten stimmen mit dem Alkaloid Vallesiachotamin überein. Durch Co-Chromatographie konnte dies bestätigt werden.



Vallesiachotamin

5.3.3. Anwendung der präparativen HPLC-Methode zur Isolierung der Alkaloide aus R. stricta

Eine weitere sehr schnelle Methode zur Trennung von Alkaloidrohextrakten ist die HPLC-Methode. So war es möglich mit einer präparativen Säule Alkaloidmengen bis zu 200 µg bei guter Trennleistung zu chromatographieren (vergl. II 5.3.). Zur Detektion wurde eine Wellenlänge gewählt, bei der ein Großteil der vorliegenden Alkaloide eine Absorption zeigen. Quantitative Aussagen können aus diesem Grunde nicht getroffen werden.

Im Folgenden sind die Bedingungen und die Retentionszeiten zusammengefaßt :

Säule	Präparative Säule von Macherey und Nagel
Säulenmaterial	Nucleosil 7 C 8
Fließmittel	Acetonitril/Wasser (10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$)
Gradient	50:50 $\xrightarrow{50 \text{ min}}$ 99:1
Flußrate	2 ml/min
Probenvolumen	250 μl
Detektion	280 nm

Retentionszeiten :

Vallesiachotamin	10,21 min
Eburnamin	19,67 min
Akuammidin	25,58 min
Norfluorocurarin	26,72 min
1,2-Dehydroaspidospermidin	28,77 min
Eburnamonin	29,47 min
Akuammicin	32,55 min
Tetrahydrosecodin	33,95 min
Tabersonin	38,75 min
Vincadifformin	46,11 min

Die alkaloidführenden Fraktionen wurden aufgefangen (vergl. II 5.3.). Durch mehrfaches Wiederholen dieses Vorganges konnte soviel Substanz angereichert werden, daß eine genaue Zuordnung der jeweiligen Peaks möglich war.

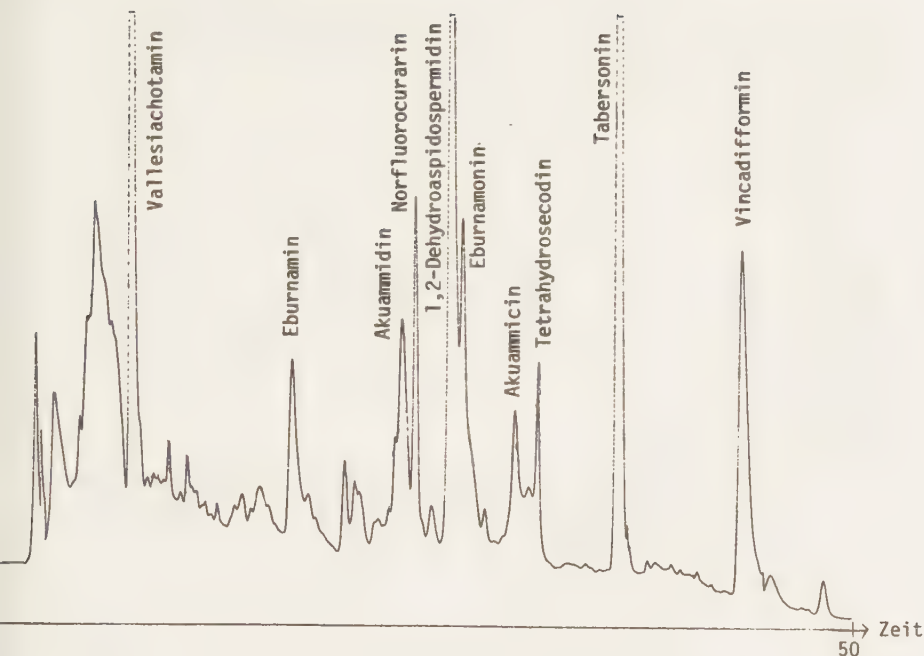


Abb. 26 : Trennung des Alkaloid-Rohextraktes von R. stricta

5.4. Veränderung des Kulturmediums

Das R. stricta Gewebe wurde in 4 unterschiedliche Medien überimpft (4X, LS, AP und ein AP-Medium, dem noch zusätzlich Tryptophan zugesetzt wurde = AP-Try).

Nach 21 Tagen wurde abgeerntet und unter ebenfalls gleichen Bedingungen ein Alkaloidrohextrakt hergestellt (II 7). Durch dünnschichtchromatographischen Vergleich konnte bei dem, im AP-Try-Medium gewachsenen Gewebe, ein mindestens doppelt so hoher Alkaloidgehalt festgestellt werden.

5.5. Kinetische Untersuchungen

5.5.1. Wachstumsparameter des Zellmaterials und Alkaloidbildung

Abb. 27 gibt den Verlauf der Wachstumskurve von *Rhazya stricta* Gewebe im 4X Medium und die Bildung der Alkaloide wieder.

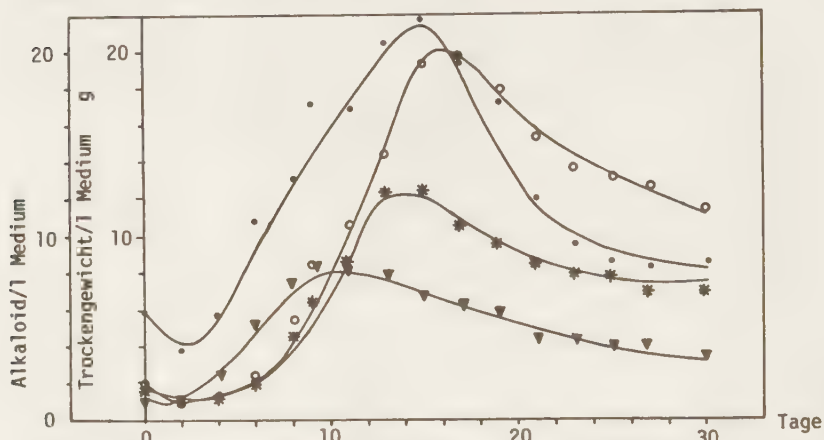


Abb. 27 : Trockengewicht und Alkaloidbildung bei *R. stricta*

- : Trockengewicht
- : Tabersonin
- *—* : Vincadifformin
- ▼—▼ : Akuammicin

Ab dem 2. Tag konnte eine Zunahme der Gewebemasse festgestellt werden. Bis zum 15. Tag nahm das Trockengewicht bis auf 20,52 g/Liter Medium zu. Nach dem 15. Tag kamen die Zellen in die letale Phase. Die Alkaloidbildung setzte parallel, beim Tabersonin und Vincadifformin um 1-2 Tage zeitversetzt ein. Diese beiden Alkaloide erreichen ihre höchsten Werte fast gleichzeitig zwischen dem 14. und 16. Tag, während Akuammicin sein Maximum in dem Bereich zwischen dem 9. und 12. Tag erreicht. Die quantitative Erfassung der Alkaloide erfolgte mit Hilfe der HPLC-Analytik.

5.5.2. Parameter des Kulturmediums

In Abb. 28 ist zu erkennen, daß der Saccharoseverbrauch sofort einsetzt und die vorhandene Menge sehr schnell abnimmt. Nach dem 15. Tag ist die gesamte Kohlenstoffquelle verbraucht. Die Leitfähigkeit, also ein Indikator für die im Medium enthaltenen Salze, zeigt analog der Saccharosekurve eine Abnahme während der Wachstumsphase. Ab dem 14. Tag ist eine deutliche Zunahme zu erkennen.

Der pH-Wert sinkt zunächst von 5,5 auf 4,8 ab, steigt aber nach dem 4. Tag stetig an und erreicht am 30. Tag einen Wert von 7,2.

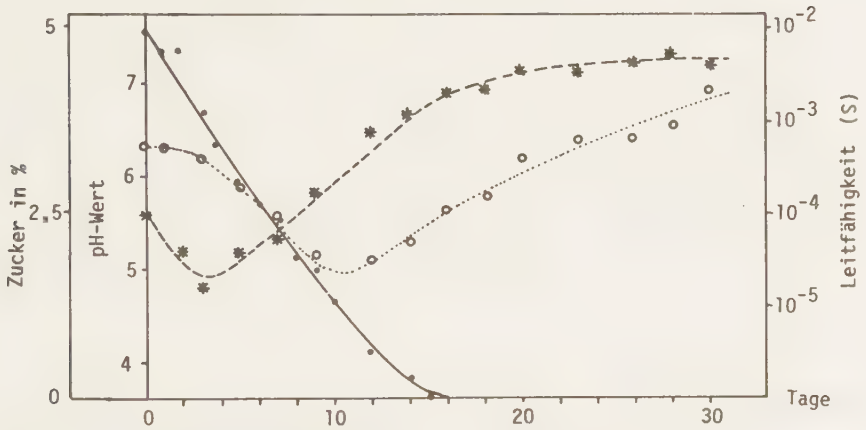


Abb. 28 : Parameter des Kulturmediums bei *Rhazya stricta*

- : Saccharosegehalt
- ○ ○ : Leitfähigkeit
- * * * : pH-Wert

Verbindung	Identifizierung	Cer-Färbung	Alkaloid-Typ
Vincadifformin	UV, EI-MS, $[\alpha]_D^{20}$	blau	A
Tabersonin	UV, EI-MS, IR, $[\alpha]_D^{20}$	blau	A
1,2-Dehydroaspidospermidin	UV, EI-MS, CI-MS, Co-Chr., $[\alpha]_D^{20}$	orange	A
Tetrahydrosecodin	UV, EI-MS, $[\alpha]_D^{20}$	blaugrün	Se
Eburnamonin	UV, EI-MS, $[\alpha]_D^{20}$	gelb	A
Akuammicin	UV, EI-MS, CI-MS, Co-Chr., $[\alpha]_D^{20}$	blau	S
Norfluorourarin	UV, EI-MS, Co-Chr., $[\alpha]_D^{20}$	blau	S
Akuammidin	UV, EI-MS, CI-MS, Co-Chr.	grau	Sa
Eburnamin	UV, EI-MS, $[\alpha]_D^{20}$	gelb	A
Strictosidinlactam	UV, EI-MS, DCI-MS, Co-Chr.	gelb	C
Vallesiachotamin	UV, EI-MS, Co-Chr.	gelb	C

Tabelle 10 : Isolierte Verbindungen aus Rhazya stricta

(A=Aspidosperma-, C=Corynanthe-, S=Strychnos-, Sa=Sarpagin-, Se=Secodin-Typ)

6. Alkaloide aus Stemmadenia tomentosa Grenman var. palmeri (Rose)

6.1. Beschreibung der Pflanze

Stemmadenia tomentosa gehört zusammen mit Tabernaemontana divaricata und Tabernanthe iboga in den Tribus Tabernaemontaneae. Die Pflanze ist ca. 5-10 m hoch und wächst im tropischen Dschungel von Mexico. Während andere Stemmadenia-Arten wie S. galleottiana (DOMINGUEZ et al. 1976), S. obovata (SAENZ et al. 1965) und S. dolnell-smithii (WALLS et al. 1958) ausführlich untersucht wurden, sind von S. tomentosa nur die Alkaloide Coronaridin, Tabersonin aus dem Samen und Stemmadenin aus der Frucht bekannt (COLLERA et al. 1962).

6.2. Beschreibung der Zellkultur

Der Kallus von S. tomentosa var. palmeri wurde aus steril gekeimten Samen angelegt. Für die Plattierung wurde mit Agar verfestigtes 4X-Medium verwendet. Dieses Medium wurde zunächst auch für die Kultivierung im flüssigem Medium übernommen. Später stellte sich das LS-Medium als besser geeignet heraus.

Zur Isolierung der Alkaloide wurde zusammen 2,5 kg Gewebe herangezogen. Die hellgelbe Suspensionskultur ist gut gewachsen und konnte nach 5-7 Tagen überimpft werden. Für die Produktion war der späteste Aberntetermin 14 Tage nach dem Überimpfen, da die Kultur später braun wurde und in die letale Phase kam, wie durch mikroskopische Untersuchungen festgestellt werden konnte.

Pro Literkolben erhielt man 228 g Frischgewicht, das entspricht 12,1 g Trockengewicht (=5,3%).

6.3. Aufarbeitung des Gewebes

Für die Isolierung der Alkaloide wurde das S. tomentosa Gewebe zweimal mit 2 Liter Essigester und 100 ml eines Na_2CO_3 -Puffers (pH 9) für 24 Stunden im Kühlraum gerührt. Daraufhin abfiltriert, eingedampft, die organischen Phasen wie unter II 7. beschrieben aufgearbeitet und über Dünnschichtchromatographie gereinigt. Als Fließmittel wurde FM 3 verwendet. Der Rohextrakt konnte in 5 unterschiedliche,

alkaloidführende Banden aufgetrennt werden (STÖCKIGT et al. 1982).

Isolierungsschema :

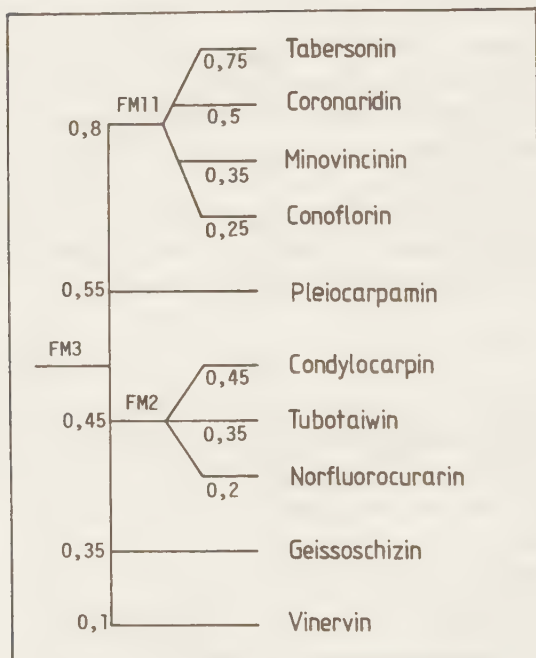
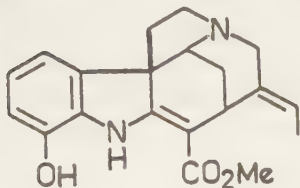


Abb. 29 : Hauptalkaloide aus Stemmadenia tomentosa
 Banden 1 bis 5 von unten nach oben.
 Die Zahlen geben die jeweiligen Rf-Werte an.

6.3.1. Alkaloidisolierungen und Identifizierung

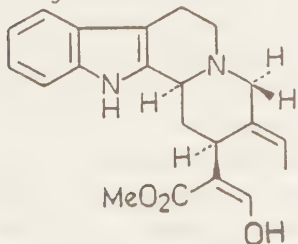
Bande 1 stellt mit einem Rf-Wert von 0,1 im FM 3 die polarste Fraktion dar. Der Reinigungsschritt im FM 5 brachte eine Substanz mit einer grauroten Cer-Färbung. Bei 366 nm war eine weißlichgelbe Fluoreszenz zu erkennen. Das UV-Spektrum, der bathochrome shift nach Zugabe methanolischer KOH ($\lambda_{\text{max}} 335 \rightarrow 355 \text{ nm}$), das Massenspektrum mit dem Molekularpeak bei 338 m/z (M^+) und das Acetylierungsprodukt ($M^+ = 380 \text{ m/z}$, Monoacetat) zeigt, daß es sich bei der isolierten Substanz um das schon bei Tabernaemontana divaricata beschriebene Alkaloid Vinervin handelt. Durch Co-Chromatographie mit authentischem Vinervin

konnte dies bestätigt werden.



Vinervin

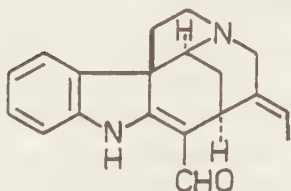
Bande 2 mit dem Rf-Wert von 0,35 hat bei der Rechromatographie im FM 12 einen Rf-Wert von 0,3. Beim Besprühen mit Cer-Reagenz zeigt die Substanz eine gelbliche Färbung. Das UV-Spektrum mit den Maxima bei 289, 280 und 226 nm gibt noch keine genügende Auskunft über das vorliegende Alkaloid. Im Massenspektrum liegt der Molekularpeak bei 352 m/z. Die weitere Fragmentierung stimmt mit dem zum Corynanthe-Typ gehörenden Alkaloid Geissoschizin überein. Geissoschizin konnte bis vor einigen Jahren nicht als natürliches Produkt isoliert werden, es wurde immer nur als Teil des Geissospermins, einem dimeren Alkaloid aus der brasilianischen Pflanze Geissospermum laeve (Vellozo) Baillon erhalten (CORDELL 1981). Als monomeres Alkaloid ist es zuerst in Catharanthus roseus gefunden worden. Durch Co-Chromatographie und mit Hilfe der HPLC-Analytik (III 6.5.) konnte Geissoschizin eindeutig nachgewiesen werden.



Geissoschizin

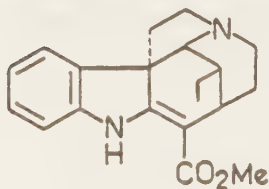
Bande 3 wurde im FM 2 rechromatographiert, sie enthielt 3 Alkaloide mit den Rf-Werten 0,2; 0,35 und 0,45. Alle 3 Substanzen zeigten mit Cer-sulfat eine blaue Färbung. Die am niedrigsten laufende Verbindung hat ein UV-Spektrum mit dem für Indolalkaloide unüblichen Maximum bei 360 nm. Der Molekularpeak liegt im Massenspektrum bei 292 m/z (M^+). Am Auffälligsten ist ein Peak bei 263 m/z, der bei der Abspaltung einer Aldehyd-Gruppe entsteht. Es handelt sich hier um das schon bei Ochrosia elliptica beschriebene Alkaloid Norfluorocurarin.

Ein weiteres Erkennungsmerkmal ist die dem Curare-Alkaloid C-Fluorocurarin analoge Verschiebung der Absorptionsmaxima in alkalischer Lösung (PHILIPSBORN et al. 1959) und die intensiv grüne Färbung mit Eisen(III)-chlorid-Lösung. Die Identität konnte letztendlich noch durch die Bestimmung des außergewöhnlich hohen Drehwertes von -1210° (Lit. : -1230°) bestätigt werden.



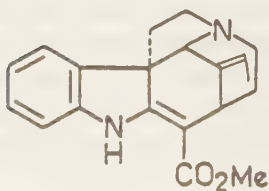
Norfluorocurarin

Die beiden anderen Substanzen haben das, für den α -Methylenindolin-carbonsäureester-Chromophor typische UV-Spektrum mit den Maxima bei 326, 298 und 228 nm. Die Substanz mit dem Rf-Wert von 0,35 hat ein Molekulargewicht (M^+) von 324. Die weitere Fragmentierung mit den Peaks bei 295 ($M^+ - CO_2CH_3$), 182, 181 und 180 m/z ist identisch mit dem schon bei Amsonia ciliata beschriebenen Tubotaiwin. Durch Bestimmung der optischen Drehung konnte das zum Strychnos-Typ gehörende Alkaloid identifiziert werden.



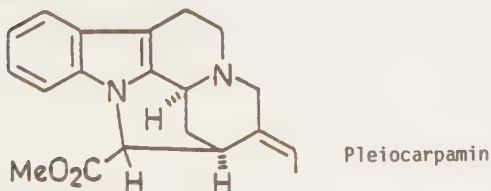
Tubotaiwin

Die dritte Substanz aus Bande 3 hat ein Molekulargewicht (M^+) von 322. Auch hier ist ein deutlicher Peak bei $M^+ - CO_2CH_3$ (263 m/z) zu erkennen. Die weitere Fragmentierung mit dem Basispeak bei 121 m/z ist identisch mit dem Fragmentierungsmuster von Condyllocarpin (BIEMANN et al. 1962a).

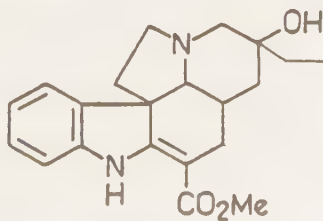
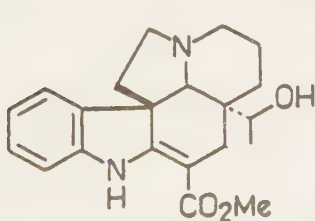


Condyllocarpin

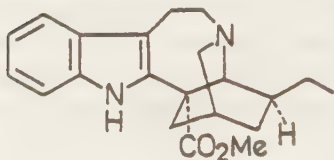
Bande 4 wurde im FM 6 nochmals chromatographiert und es ließ sich eine Verbindung eluieren, die mit Cer-sulfat eine violette Färbung ergab. Massenspektroskopisch sind außer dem Molekularpeak bei 322 m/z nur noch zwei signifikante Fragmente erwähnenswert : der Peak bei 263 m/z, der durch die Abspaltung der Carboxymethylgruppe entsteht und ein intensiver Peak bei 180 m/z, der das stabile Chinolinium-Ion darstellt (vergl III 4.3.1.). Diese Daten und das UV-Spektrum mit den Maxima bei 285 und 230 nm stimmen mit dem Pleiocarpamin überein. Durch Co-Chromatographie konnte wiederum Pleiocarpamin nachgewiesen werden.



Bande 5 konnte im FM 11 in 4 Alkaloide aufgetrennt werden. Die erste Substanz zeigt eine blaue Cer-sulfat Reaktion. Im UV-Spektrum liegen die Maxima bei 328, 298 und 224, auch die massenspektroskopische Fragmentierung deutet auf ein Alkaloid vom Aspidosperma-Typ hin (HESSE 1979). Die Verbindung hat ein Molekulargewicht von 354. Die weiteren Bruchstücke stimmen mit denen von Pandolin/Epipandolin (ZECHES et al. 1975), aber auch mit denen von Minovincinin/Epiminovincinin (PLAT et al. 1962a) überein. Um zwischen den beiden Epimeren unterscheiden zu können wurde mit Acetanhydrid/Pyridin acetyliert. Es entstand ein Acetylierungsprodukt mit einem Molekulargewicht von 396 (M⁺, Monoacetat). Dadurch konnten die Pandoline ausgeschlossen werden, da deren Hydroxylgruppe nicht acetylierbar ist. Durch Vergleich der spektroskopischen Daten und Co-Chromatographie mit authentischer Substanz konnte (-)-Minovincinin nachgewiesen werden.

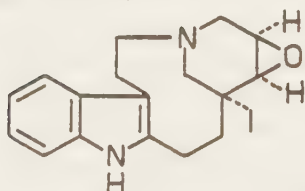


Die zweite Substanz (Rf-Wert 0,35) aus Bande 5 hat eine grüne Cerfärbung. Das UV-Spektrum und das Massenspektrum mit dem Molekularpeak bei 338 m/z stimmt mit dem bei Tabernaemontana divaricata beschriebenen Coronaridin überein.



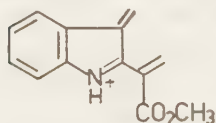
Coronaridin

Die dritte Verbindung zeigt identische Daten mit dem Conoflorin (vergl. III 2.3.).

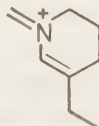


Conoflorin

Die am wenigsten polare Verbindung aus Bande 5 hat eine blaue Cerfärbung und zeigt bei 366 nm eine blaue Fluoreszenz. Das UV-Spektrum mit den Maxima bei 328, 298 und 230 ist wiederum für einen α -Methylenindolin-Chromophor charakteristisch. Massenspektroskopisch erkennt man den Molekularpeak (M^+) bei 336 m/z, weiterhin einen Peak bei 214 und bei 135 m/z, die für das zuerst aus den Samen von Amsonia tabernaemontana isolierte Tabersonin kennzeichnend sind (JANOT et al. 1954).

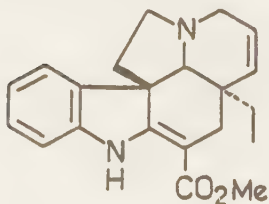


214 m/z



135 m/z

Durch Co-Chromatographie und Bestimmung der optischen Drehung konnte eindeutig Tabersonin identifiziert werden.



Tabersonin

6.4. Die Stellung von Stemmadenin in der Biosynthese von mono-terpenoiden Indolalkaloiden

Interessant erscheint, wie bei Tabernaemontana divaricata, das gemeinsame Auftreten der Strychnos-Typ-Alkaloide (-)-Vinervin, (-)-Norfluorocurarin und (+)-Tubotaiwin, Condyllocarpin, die sich dadurch unterscheiden, daß :

- Beim Vinervin C7 mit C3 und beim Tubotaiwin C7 mit C21 verknüpft ist.
- Bei Tubotaiwin und Condyllocarpin H15 in B-, die Tryptaminbrücke in α -Stellung vorliegt, während man bei Vinervin und Norfluorocurarin entgegengesetzte Verhältnisse vorfindet.

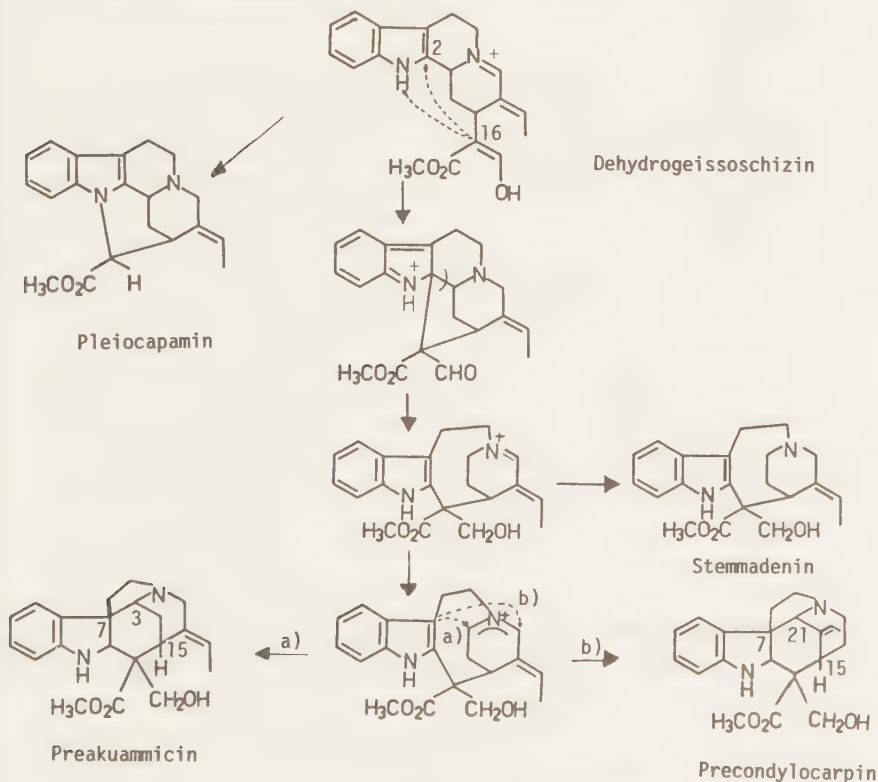


Abb. 30 : Eine mögliche Bildung der Alkaloide des Strychnos-Typs nach CORDELL (1974).

Wie schon bei III 1. erwähnt, scheint hier eine gemeinsame Vorstufe vorhanden zu sein. Von vielen Autoren (WENKERT 1962, SCOTT 1969, CORDELL 1974) wird nach dem Dehydrogeissoschizin Stemmadenin oder die noch nicht reduzierte Vorstufe zum Stemmadenin als eines der wichtigsten Intermediate in der Biosynthese der Strychnos-, Aspidosperma- und Iboga-Typ-Alkaloide angesehen.

Wie in Abb. 30 verdeutlicht wird, kann durch die Reaktion von C16 mit C2 im Dehydrogeissoschizin und nachfolgender Reduktion Stemmadenin entstehen. Ein nucleophiler Angriff von C7 an C3 oder von C7 an C21 führt zum Preakuammicin oder Precondylocarpin, die bei der nachfolgenden Abspaltung der $-CH_2OH$ -Gruppe Akuammicin bzw. Condyllocarpin ergeben.

Auch Stemmadenin, das zuerst aus Stemmadenia donell-smithii isoliert wurde, kann in vitro durch Oxidation mit Kaliumpermanganat zum Condyllocarpin überführt werden (vergl. II 4.3.). Eine Verknüpfung von C7 mit C3 zum Akuammicin erfolgt unter diesen Bedingungen nicht. Man nimmt an, daß hier die Stellung der Substituenten an C16 entscheidend ist und Akuammicin aus 16-Epi-stemmadenin entsteht (CORDELL 1981).

Beim Dehydrogeissoschizin ist nicht nur die Verknüpfung von C16 mit C2 möglich, sondern auch die von C16 mit dem Indolstickstoff. Dies führt zum Pleiocarpamin, das ebenfalls aus der S. tomentosa Zellkultur isoliert wurde.

Es wird angenommen, daß man über das Stemmadenin auch zu den Alkaloiden des Aspidosperma- und Iboga-Typs gelangen kann (SCOTT 1974). In Abb. 31 ist dargestellt, daß dazu die C15-C16 Bindung geöffnet werden muß. Es entsteht ein reaktives Acrylsäureester-Intermediat, das durch nucleophilen Angriff an C20/C21 oder C14/C21 zum Aspidosperma- und zum Iboga-Typ reagieren kann.

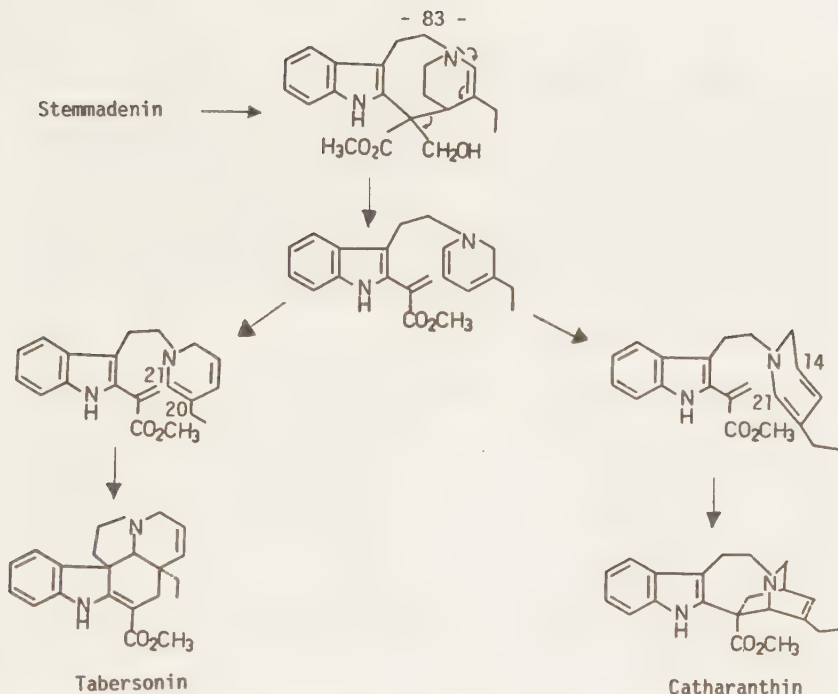


Abb. 31 : Eine mögliche Bildung der Alkaloide des Aspidosperma- und des Iboga-Typs, ausgehend vom Stemmadenin nach SCOTT (1974).

6.4.1. Nachweis von Stemmadenin

Es erschien somit interessant zu untersuchen, ob das aus Stemmadenia-Arten schon mehrfach isolierte Stemmadenin (KUTNEY et al. 1975, COLLERA et al. 1962, WALLS et al. 1962) auch in der Zellkultur von Stemmadenia tomentosa produziert wird. Bei der unter III 6.3. beschriebenen Aufarbeitung des Gewebes war es nicht möglich Stemmadenin zu isolieren und nachzuweisen. Es mußte ein Verfahren gefunden werden, bei dem auch eventuell kleinste vorhandene Mengen nachweisbar sind. Zu diesem Zweck wurde ein HPLC-Trennsystem entwickelt.

Säule	analytische Säule von Merck (0,4 x 25 cm)
Säulenmaterial	RP 18
Fließmittel	Acetonitril/Wasser (10 mM (NH ₄)CO ₃)
Gradient	50:50 $\xrightarrow{25 \text{ min}}$ 99:1
Flußrate	1 ml/min
Probenvolumen	20 µl
Detektion	283 nm

Retentionszeit von Stemmadenin : 13,0 min

Von den untersuchten Geweben wurden Alkaloidrohextrakte entsprechend dem unter II 7. beschriebenen Verfahren oder nur Methanolextrakte hergestellt und unterschiedliche Konzentrationen auf die Säule aufgegeben. Stemmadenin wurde als externer oder interner Standard verwendet. War bei der Retentionszeit von 13 min ein Peak zu erkennen, wurde die Fließmittelzusammensetzung oder die Analysendauer verändert, um Falschzuordnungen zu vermeiden.

Folgende Suspensionskulturen wurden getestet :

Stemmadenia tomentosa

Amsonia ciliata

Catharanthus roseus

Ochrosia elliptica

Rauwolfia serpentina

Rhazya stricta

Tabernaemontana divaricata

Tabernanthe iboga

Voacanga africana

In keinem der untersuchten Gewebe konnte Stemmadenin nachgewiesen werden.

Falls die oben dargestellten Biosynthesevorstellungen zutreffen sollten, lag die Vermutung nahe, daß bei den getesteten Geweben, die alle nach 14 bis 21 Tagen Wuchsdauer abgeerntet wurden, Stemmadenin schon vollständig in die jeweiligen Endprodukte umgewandelt war. Daher wurden auch die Proben der Gewebekinetik (III 6.6.1.) untersucht. Weder hier noch bei den Gewebeproben aus Medien unterschiedlicher Zusammensetzung (III 6.5/6.7) konnte Stemmadenin nachgewiesen werden. Dies kann zum großen Teil daran liegen, daß die Nachweispfindlichkeit zu gering war, aber auch daran, daß Stemmadenin oder eine der Vorstufen sofort in die entsprechenden Endprodukte umgewandelt wurde.

6.5. Optimierung der Wachstumsbedingungen

Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist die Medienzusammensetzung

eine der wichtigsten Faktoren bei der Alkaloidproduktion. Aus diesem Grunde wurde die Suspensionskultur von S. tomentosa in unterschiedliche Medien auf ihr Wachstum und auf die Alkaloidproduktion hin untersucht.

Die quantitative Bestimmung des Alkaloidgehaltes erfolgte mit Hilfe der HPLC-Analytik, wobei die Parameter aus III 6.4.1. weitgehend übernommen wurden (Analysenlauf 40 min).

Alkaloid	Retentionszeit	gemessen bei Wellenlänge
Conoflorin	16,6 min	280 nm
Coronaridin	21,0 min	280 nm
Geissoschizin	9,5 min	280 nm
Minovincinin	8,7 min	328 nm
Norfluorocurarin	29,0 min	360 nm
Tabersonin	19,3 min	328 nm
Tubotaiwin	17,4 min	328 nm

Tabelle 11 : Retentionszeiten einiger S. tomentosa Alkaloide

Wie aus Tabelle 11 ersichtlich wurden die Retentionszeiten bei unterschiedlichen Wellenlängen registriert, um in dem jeweiligen Maximum der Absorption messen zu können.

Von den Alkaloiden Coronaridin, Conoflorin, Minovincinin und Tabersonin wurden Eichlösungen definierter Konzentration hergestellt, die wie unter II 5.4. beschrieben für die quantitativen Messungen herangezogen wurden.

In Abb.32 kann man erkennen, daß das LS-Medium einen erheblichen Einfluß auf die Alkaloidproduktion hat. Im Vergleich zum 4X-Medium (Tabersonin 5,3 mg/Liter Medium) kann man beim LS-Medium einen um den Faktor 20 höheren Wert erkennen (Tabersonin 105 mg/Liter Medium). Das Trockengewicht pro Liter Medium ist bei allen Medien ungefähr gleich, es ist nur ein Unterschied um den Faktor 1,4 feststellbar.

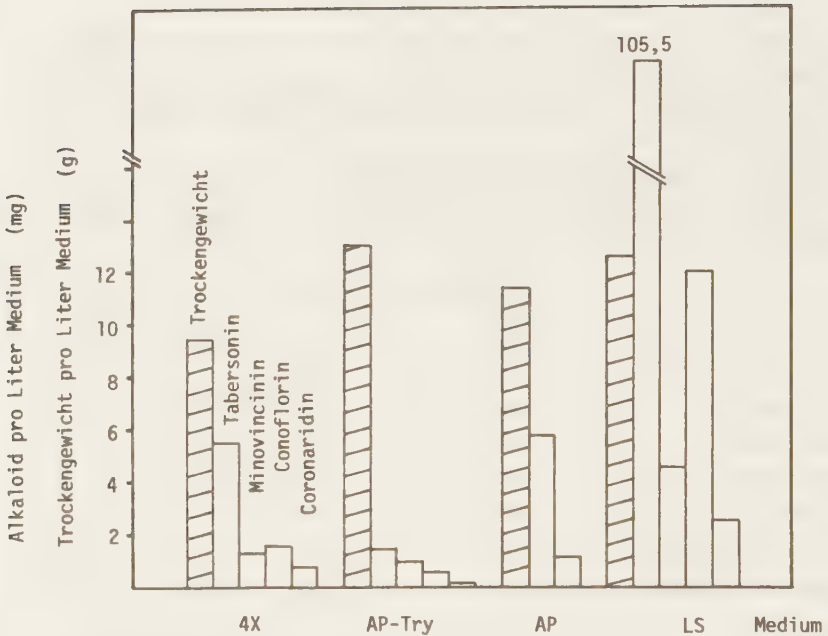


Abb. 32 : Optimierung der Wachstumsbedingungen durch Überführen des S. tomentosa Gewebes in unterschiedlichen Kulturmedien.

6.6. Kinetische Untersuchungen

6.6.1. Wachstumsparameter des Zellmaterials und Alkaloidbildung

Abb. 33 gibt den Verlauf der Wachstumskurve von S. tomentosa im 4X Medium und die Bildung der Alkaloide wieder. Bereits nach einem Tag konnte eine Zunahme der Zellmasse festgestellt werden, die lag-Phase ist kurz. In den darauffolgenden Tagen nahm das Trockengewicht auf 9,5 g pro Liter Medium zu. Nach dem 14. Tag kamen die Zellen in die letale Phase. Die Synthese der Alkaloide setzt parallel zwischen dem 3. und 4. Tag ein. Tabersonin und Conoflorin erreichen ihre höchsten Werte zwischen dem 6. und dem 9. Tag, während Minovincinin und Coronaridin ihr Maximum zwischen dem 9. und dem 12. Tag haben. Wie unten noch erläutert, ist das starke Abfallen der Alkaloidkonzentration mit einem drastischen Anstieg der Leitfähigkeit korreliert, was auf ein vermehrtes Vorhandensein von Zelltrümmern hinweist. Die quanti-

tative Erfassung der Alkaloide verlief analog dem unter III 6.5. beschriebenen Verfahren.

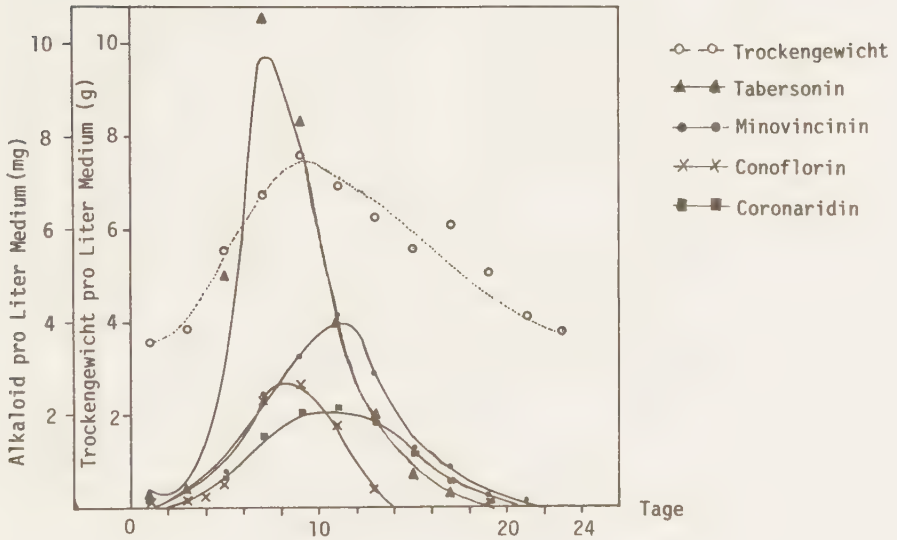


Abb. 33 : Wachstumsparameter des *S. tomentosa* Zellmaterials und Alkaloidbildung

6.6.2. Parameter des Kulturmediums

Wie in Abb. 34 ersichtlich setzt der Saccharose-Verbrauch aus dem Medium sofort ein. Während der Wachstumsphase konnte eine schnelle Abnahme beobachtet werden, ab dem 17. Tag ist die Kohlenstoffquelle verbraucht gewesen. Die Leitfähigkeit zeigt wie die Saccharosekurve eine Abnahme während der Wachstumsphase, ab dem 12. Tag ist aber eine starke Zunahme zu verzeichnen gewesen. Beobachtungen unter dem Mikroskop zeigten, daß im Vergleich zu den ersten Tagen die Zahl der zerstörten Zellen erheblich angestiegen war. Der pH-Wert stieg nach einem kurzen Absinken stetig über den eingestellten Wert hinaus.

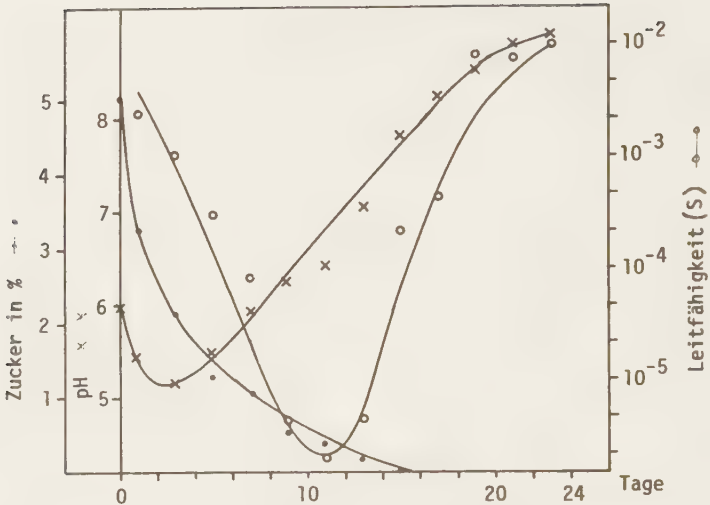


Abb. 34 : Parameter des *S. tomentosa* Kulturmediums

6.7. Veränderung der Medienzusammensetzung

Durch die Änderung der Konzentrationen der im Medium vorkommenden anorganischen Salze versucht man die Alkaloidproduktion zu erhöhen (KNOBLOCH et al. 1980). Vergleichbares war bei der Bildung von sekundären Metaboliten bei Mikroorganismen gelungen.

Entsprechend der Tabelle 12 wurde die Zusammensetzung des AP-Mediums verändert.

Nr.	Salz	Menge
1	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	100 mg
2	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	25 mg
3	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	25 mg
4	MnSO_4	5 mg
5	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	200 mg
	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	25 mg
6	normales Medium	

Tabelle 12 : Veränderung der Zusammensetzung des AP-Mediums bei der Suspensionskultur von *S. tomentosa*

Das Ergebnis ist in Abb. 35 zu sehen. Man erkennt, daß außer bei dem Medium Nr.2 in Bezug auf die Alkaloidproduktion nur ein negativer Effekt feststellbar ist. Das Trockengewicht zeigt nur schwache Schwankungen.

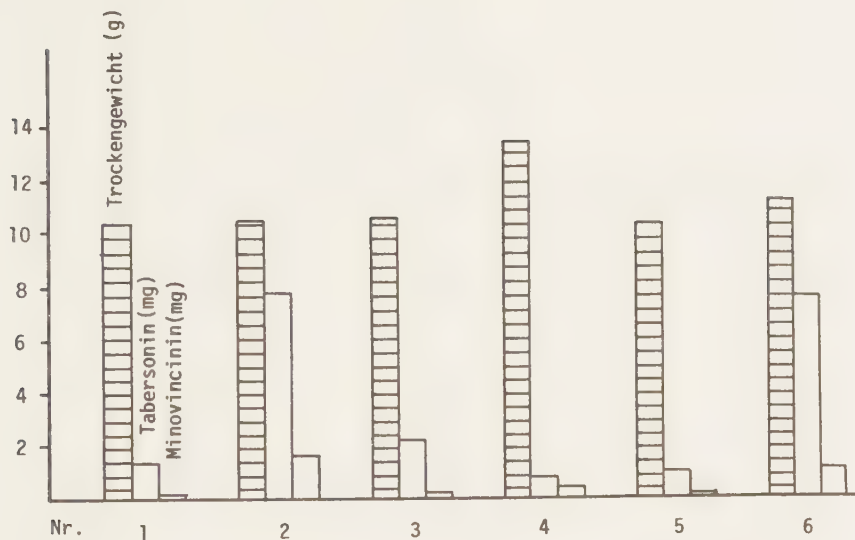


Abb. 35 : Einfluß der zusätzlich zum Medium zugegebenen anorganischen Salze auf Trockengewicht und Alkaloidproduktion des S. tomentosa Gewebes

Verbindung	Identifizierung	Cer-Färbung	isolierte Menge µg/L Medium	Alkaloid-Typ
Vinervin	UV, EI-MS, Acetylierung, Co-Chr., HPLC, $[\alpha]_D^{20}$	rötlich	14,4	S
Geissoschizin	UV, EI-MS, Co-Chr., HPLC	gelb	kein Wert	C
Norfluorourarin	UV, EI-MS, HPLC, $[\alpha]_D^{20}$	blau	5,8	S
Tubotaiwin	UV, EI-MS, CI-MS, HPLC, $[\alpha]_D^{20}$	blau	92	S
Condylocarpin	UV, EI-MS, Co-Chr.	blau	kein Wert	S
Pleiocarpamin	UV, EI-MS, Co-Chr.	graubraun	kein Wert	P1
Conoflorin	UV, EI-MS, CI-MS, Co-Chr., HPLC, $[\alpha]_D^{20}$	rot	221	A
Minovincinin	UV, EI-MS, CI-MS, HPLC, $[\alpha]_D^{20}$	blau	95	A
Coronaridin	UV, EI-MS, HPLC, $[\alpha]_D^{20}$	grün	27	I
Tabersonin	UV, EI-MS, Co-Chr., HPLC, $[\alpha]_D^{20}$	blau	49	A

Tabelle 13 : Isolierte Verbindungen aus Stemmadenia tomentosa

(A=Aspidosperma-, C=Corynanthe-, I=Iboga-, P1=Pleiocarpamin-, S=Strychnos-Typ)

7. Alkaloide aus Voacanga africana Stapf.

7.1. Beschreibung der Pflanze

Aus der in Afrika heimischen Apocynaceae Voacanga africana konnten bis heute weit über 50 Indolalkaloide monoterpenoiden Ursprungs isoliert werden. Ein Großteil dieser Alkaloide gehört zum Iboga-Typ, wobei sowohl monomere wie auch dimere Strukturen gefunden wurden (eine kleine Übersicht bietet TAYLOR 1965 und TAYLOR 1968). Eine weitere große Gruppe sind die Aspidosperma-Typ-Alkaloide, deren überwiegende Anzahl allerdings als Bis-Indolalkaloide vorliegt (KUNESCH et al. 1968, KUNESCH et al. 1970, NARANJO et al. 1972, KUNESCH et al. 1981).

Bei breit angelegten pharmakologischen Untersuchungen dieser Pflanze konnte eine sedierende Wirkung festgestellt werden (RENNER et al. 1957, VOGEL et al. 1961, FISH et al. 1966).

Die Bearbeitung einer Zellkultur von Voacanga africana erschien besonders im Hinblick auf die, in der differenzierten Pflanze in großer Anzahl vorkommenden dimeren Indolalkaloide interessant, da aus Suspensionskulturen nur monomere Verbindungen isoliert werden konnten.

7.2. Beschreibung der Zellkultur

Der Kallus wurde aus Blättern von Voacanga africana angelegt. Der dunkle Kallus, der auf LS-Medium wuchs, ist im Vergleich zu den oben beschriebenen Kulturen relativ langsam gewachsen. Die Kultivierung im flüssigen Medium erfolgte im 4X-Medium, für die Erhaltung wurde LS-Medium verwendet.

Pro Liter Medium (4X) konnten 126 g Zellmasse (Frischgewicht) abgeerntet werden. Das Trockengewicht betrug 7,3%.

Für die Alkaloidisolierungen und Identifizierungen wurden ca. 15 kg Gewebe benötigt.

7.3. Erste Alkaloidbestimmung

7.3.1. Aufarbeitung des Gewebes

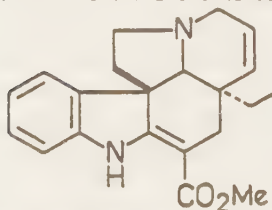
Die Extraktion der Alkaloide erfolgte mit 900 g V. africana Gewebe (entspricht 65,8 g Trockengewicht). Das mit flüssigem Stickstoff ein-

gefrorene Zellmaterial wurde dreimal mit Essigester im Kühlraum bei +5° C extrahiert. Die Essigesterphasen wurden eingengt und wie unter II 7. beschrieben aufgearbeitet. Der so erhaltene Rohextrakt wurde im FM 1 chromatographiert. Es konnten 3 alkaloidführende Banden eluiert werden, wobei aber 2 Banden zu wenig Substanz für eine exakte Charakterisierung enthielten (STÖCKIGT et al. 1982).

7.3.2. Alkaloidisolierungen und Identifizierung

Die Hauptfraktion wurde im FM 13 rechromatographiert, wobei sich 3 Banden voneinander abtrennten (Rf-Werte : 0,4; 0,7; 0,8). Alle 3 Substanzen zeigten im UV-Spektrum die gleichen Maxima (λ_{max} : 328, 298 und 226 nm), die typisch für den β -Anilinacrylat-Chromophor der Aspidosperma- bzw. Strychnos-Typ-Alkaloide sind.

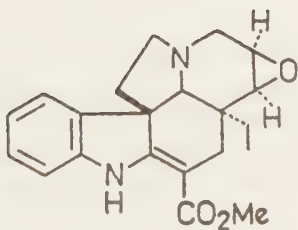
Die Substanz mit dem Rf-Wert von 0,8 hat wie die beiden anderen Alkaloide eine blaue Färbung mit Cer-Reagenz. Im Massenspektrum liegt der Molekularpeak bei 336 m/z. Die weitere Fragmentierung ist in völliger Übereinstimmung mit dem Tabersonin, das schon bei Rhazya stricta und Stemmadenia tomentosa beschrieben wurde (III 5.3.2.; 6.3.2.). Durch die Bestimmung der optischen Drehung konnte (-)-Tabersonin identifiziert werden.



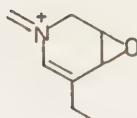
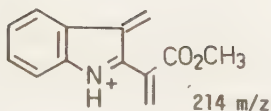
(-)-Tabersonin

Bei der zweiten Verbindung mit dem Rf-Wert von 0,7 erkennt man im Massenspektrum den Molekularpeak bei 352 m/z. Für die Identifizierung sind zwei Fragment-Ionen von besonderer Relevanz : 214 m/z, ein Bruchstück, das bei den Alkaloiden des Aspidosperma-Typs durch eine Retro-Diels-Alder Reaktion und nachfolgende Spaltung der C5-C6 Bindung entsteht und das Ion 138 m/z, das bei dieser Fragmentierung den aliphatischen Teil darstellt (vergl. Abb. 36).

Auf Grund dieser Daten konnte (-)-Lochnericin nachgewiesen werden, dessen Struktur 1963 von MOZA et al. aufgeklärt wurde.



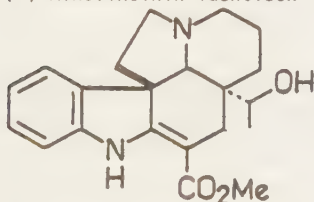
(-)-Lochnericin



138 m/z

Abb. 36 : (-)-Lochnericin mit den beiden Hauptfragmenten beim massenspektroskopischen Zerfall.

Die dritte Bande war mit dem schon bei *S. tomentosa* beschriebenen (-)-Minovincinin identisch (III 6.3.2.).



(-)-Minovincinin

7.4. Die dimeren Alkaloide Voafrin A und Voafrin B

Wie schon unter 7.3.1. erwähnt, konnten bei der Bearbeitung von 900 g Gewebe nur die Hauptalkaloide identifiziert werden. Bei der Aufarbeitung fielen aber auch zwei, in der Literatur bisher noch nicht beschriebene Alkaloide auf, die mit Cer-Reagenz eine blaue Färbung ergeben und deren UV-Spektren ebenfalls typisch für den β -Anilinsacrylat-Chromophor sind. Eine schwache Fluoreszenz bei 366 nm deutet an, daß beide Verbindungen dem *Aspidosperma*-Typ angehören. Eine massenspektroskopische Untersuchung zeigt ein übereinstimmendes Fragmentierungsmuster beider Alkaloide mit dem Molekularpeak bei 670 m/z. Dies konnte durch Messungen mit der DCI-Methode bestätigt werden.

Die beiden Substanzen wurden Voafrin A (in FM 7 Rf-Wert von 0,63) und Voafrin B (in FM 7 Rf-Wert von 0,5) benannt (STÖCKIGT et al. 1983).

Durch die Aufarbeitung größerer Gewebemengen und im ganz besonderen Maße, durch die Optimierung der Bedingungen für eine Alkaloidproduktion (vergl. III 7.5.) war es möglich für eine exakte Strukturaufklärung genügend Substanz zu isolieren.

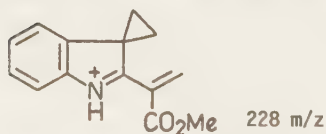
7.4.1. Säulenchromatographische Reinigung von Voafrin A und Voafrin B

Es wurden insgesamt 4,1 kg V. africana Gewebe (Trockengewicht 348 g, AP-Medium) mit Essigester extrahiert. Der so erhaltene Rohextrakt wurde in 4 Portionen mit jeweils 10 ml Volumen mit Hilfe der Säulenchromatographie aufgetrennt (vergl. II 5.2.3.). Als Fließmittel diente FM 7, bei dem die sehr apolaren Alkaloide sehr gut getrennt werden. Die Flußrate konnte wegen dem sehr geringen Eigengewicht des Fließmittels nur auf 0,5 ml/min eingestellt werden.

Nach einem dünnschichtchromatographischen Reinigungsschritt wurden insgesamt 27 mg Voafrin A und 50 mg Voafrin B isoliert.

7.4.2. Strukturaufklärung

Wie schon oben erwähnt zeigen die beiden Alkaloide im Massenspektrum ein vollständig übereinstimmendes Fragmentierungsmuster. Besonders auffällig ist ein Fragment-Ion bei 335 m/z, was exakt der Hälfte des Molekulargewichts von 670 entspricht und um eine Masseneinheit kleiner als das Tabersonin ist. Ein weiteres Bruchstück bei 214 m/z ist charakteristisch für Alkaloide des Aspidosperma-Typs (III 7.3.2.). Der Peak 228 m/z ($=C_{14}H_{14}NO_2$, berechnet 228,1024; gefunden 228,1018) und das Ion 168 m/z ($228-HCO_2CH_3$) bestärken die Vermutung, daß die vorliegenden Alkaloide das ABE-Ringsystem des Tabersonins enthalten.



Eine weitere Bestätigung findet man durch das IR-Spektrum, dessen Banden bei 2930 und 1670 cm^{-1} zeigen, daß eine NH-Gruppe und ein vinyloges Amid vorhanden sind, wie es für Alkaloide des Aspidosperma-Typs charakteristisch ist.

Eine exakte Aufklärung dieser Strukturen und eine Unterscheidung der, durch Chromatographie trennbaren, aber sonst identischen Substanzen, konnte nur mit Hilfe der NMR-Spektroskopie erfolgen.

Zwei Fragen waren von besonderem Interesse :

- welche beiden Kohlenstoffatome bilden die Verknüpfungsstelle zwischen den zwei Tabersonin-Molekülen
- an welcher Stelle sind stereochemische Unterschiede feststellbar?

Durch Aufnahme eines 500 MHz NMR-Spektrums und eines 400 MHz 2D-NMR-Spektrums konnte ein Großteil der Signale zugeordnet werden.

In Abb. 37 sind die ^1H -NMR-spektroskopischen Daten von Tabersonin, um eine Einordnungsmöglichkeit für die zu erwartenden Signale der beiden Voafrine zu haben.

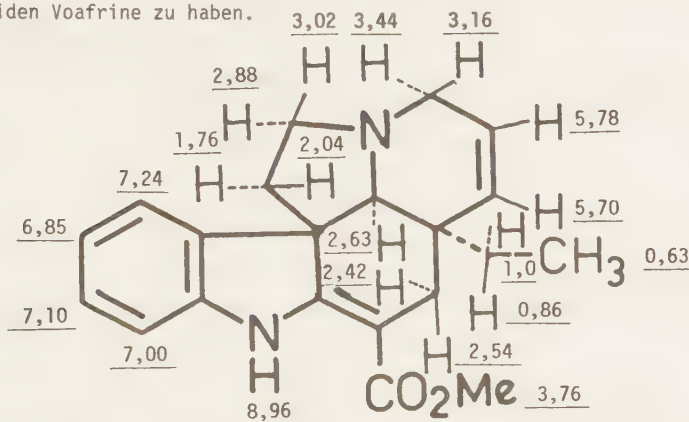


Abb. 37 : ^1H -NMR-spektroskopische Daten von Tabersonin ohne Angabe der Multiplizitäten.
Die unterstrichenen Zahlen geben die chemische Verschiebung (δ) an (nach LOUNASMAA et al. 1980).

Das ^1H -NMR-Spektrum von Voafirin B enthält 8 aromatische Protonen und 2 N-H-Signale. In diesem Bereich kann die Verknüpfung nicht erfolgt sein.

Eine weitere mögliche Verknüpfungsstelle ist die Tryptamin-Brücke (C5-C6). in Abb. 38 sind für diesen Ausschnitt die chemischen Verschiebungen und die Kopplungskonstanten des Tabersonins angegeben.

Exemplarisch für die Protonen an der Tryptamin-Brücke sei das H_α -C6 erwähnt : Zwischen H_α -C6 und H_β -C6 erkennt man eine große geminale Kopplung von 12 Hz. Die vicinalen Kopplungen mit H_α -C5 und H_β -C5 liegen bei 5,2 und 2,0 Hz. Man erhält als Kopplungsmuster ein dreifaches Dublett (ddd).

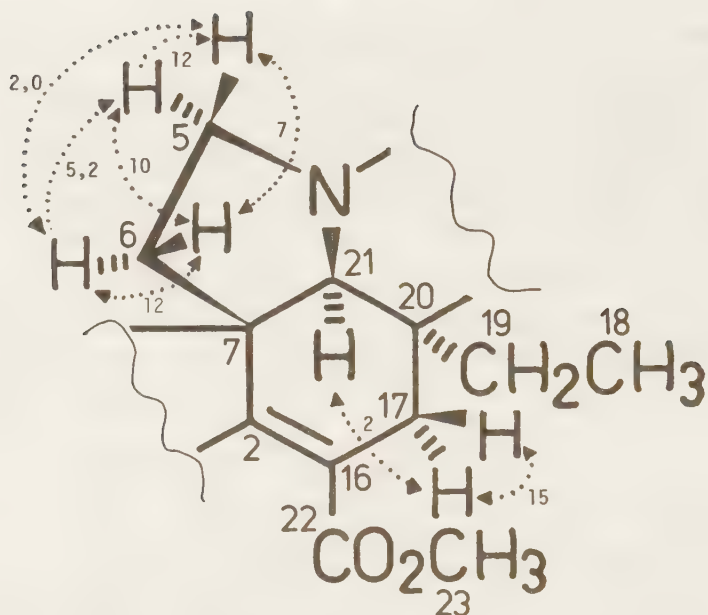


Abb. 38 : Ausschnitt aus dem Tabersonin
Die Zahlen auf den Pfeilen geben die Kopplungskonstanten an.

Jedes Proton der Tryptamin-Brücke hat dieses Kopplungsmuster. Bei der vorliegenden Verbindung treten 8 dieser Signale auf. Die chemischen Verschiebungen stimmen mit den Daten des Tabersonins überwiegend überein.

Eine weitere Protonengruppe ist von großem Interesse : H -C21 und H_α /H_β -C17. 1973 wurde von BRUNETON et al. aus der Apocynaceae *Criocera dipladeniiflorus* eine Substanz isoliert, die Ditabersonin benannt wurde. Im Vergleich zu den Voafrienen ist das UV-Spektrum und das Molekulargewicht übereinstimmend. Unterschiede sind in der massenspektroskopischen Fragmentierung zu erkennen : während bei den Voafrienen ein Hauptfragment bei 349 m/z auftritt, wurde beim Ditabersonin ein Ion bei 350 m/z beschrieben. Die zusätzlich erwähnten Fragmente 456 und 442 m/z gehören ebenfalls nicht zu den typischen Bruchstücken der Voafriene.

Ein Verknüpfungspunkt der beiden Tabersonin-Moleküle wurde in dieser Veröffentlichung nicht genau angegeben. Vorgeschlagen wurden die beiden Kohlenstoff-Atome C3 und C21. Demzufolge mußte geprüft werden, ob diese C3-C21-Bindung auch bei Voafrin A oder Voafrin B vorliegt. Wie in Abb. 38 dargestellt zeigt H_{α} -C21 beim Tabersonin eine Resonanz bei 2,63 ppm, aufgespalten zu einem breiten Dublett durch die Fernkopplung (W-Form) mit H_{α} -C17.

Das gleiche Bild kann man auch bei den Voafrinen erkennen. Auffällig sind allerdings die großen Unterschiede in den chemischen Verschiebungen von H -C21 = 2,78 ppm und H -C21' = 3,17 ppm beim Voafrin B, während beim Voafrin A dieser Effekt nicht auftritt.

Die größere Entschirmung des Protons an C21' beim Voafrin B (3,17 ppm, Voafrin A H -C21' : 2,83 ppm) scheint auf eine unterschiedliche Konfiguration der beiden Moleküle zurückzuführen zu sein.

Da auch die Protonen an C17 das in Abb. 38 dargestellte Aufspaltungsmuster aufweisen, scheiden sowohl C21/C21' als auch C17/C17' als Verknüpfungsstelle aus.

Somit kann auf Grund der massenspektroskopischen und NMR-spektroskopischen Daten mit Sicherheit eine Übereinstimmung des Ditabersonins mit Voafrin A und Voafrin B ausgeschlossen werden.

Außer der Ethylseitenkette bleiben nur noch die Protonen an C3, C14 und C15 für eine Zuordnung übrig.

Wie in Abb. 39 verdeutlicht wird, werden die beiden Protonensignale von C3 jeweils durch eine geminale, eine vicinale Kopplung und eine allylische Fernkopplung zu einem dreifachen Dublett (ddd) aufgespalten. Die großen Unterschiede in den Kopplungskonstanten von H_{α} -C3 mit H -C14 (2 Hz) und H_{β} -C3 mit H -C14 (5 Hz) kommen daher, daß der Ring D des Tabersonins bedingt durch die Doppelbindung zwischen C14 und C15, in einer modifizierten Halbsesselform vorliegt, bei der sich H_{α} -C3 in einer quasi axialen und H_{β} -C3 in einer quasi äquatorialen Orientierung befinden (LOUNASMAA et al. 1980). Auch die allylischen Kopplungen weisen diesen Unterschied auf.

Überträgt man diese Daten auf das Voafrin B, so fällt auf, daß in dem Bereich zwischen 3,2 und 4,0 ppm in dem die Protonen an C3 eine Resonanz zeigen, nur 3 Signale auftreten. Zwei der Signale haben eine

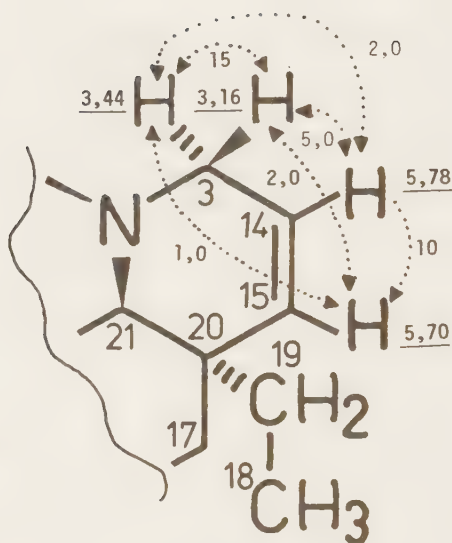


Abb. 39 : Ausschnitt aus dem Tabersonin.

Die unterstrichenen Zahlen geben die chemische Verschiebung an, die Zahlen auf den Pfeilen die Kopplungskonstanten.

eine große Kopplungskonstante von 15,4 Hz, bedingt durch eine geminale Kopplung. Bei der weiteren Aufspaltung von H_{α} - und H_{β} -C3 liegen die Kopplungskonstanten unter 2 Hz. Es kann daher nur eine allylische Fernkopplung mit H -C15 vorliegen. Die beim Tabersonin diskutierte Aufspaltung von H -C14 findet nicht statt.

Als Konsequenz können nur C14 und C3' Bindungspartner zwischen den beiden Tabersonin-Molekülen sein.

Die beiden verbleibenden Protonen an C3', C14' und C15' sind Teil eines ABX-Systems, bei dem H -C3' X ist.

In Abb. 40 sind die Kopplungsbedingungen der Verknüpfungsstelle bei den Voafrinen dargestellt. Wie man hier erkennen kann liegen bei beiden Voafrinen die vicinalen Kopplungskonstanten zwischen H -C14' und H -C15' im Bereich von 10 Hz. Unterschiede vom Voafrin A zum Voafrin B treten bei der Kopplungskonstanten von H -C3' mit H -C14' und H -C15' auf. Während man beim Voafrin A mit H -C14' einen Wert von 1,5 Hz findet, erkennt man beim Voafrin B einen von 4,6 Hz. Bei der allylischen Kopplung mit H -C15' lagen die Kopplungskonstanten

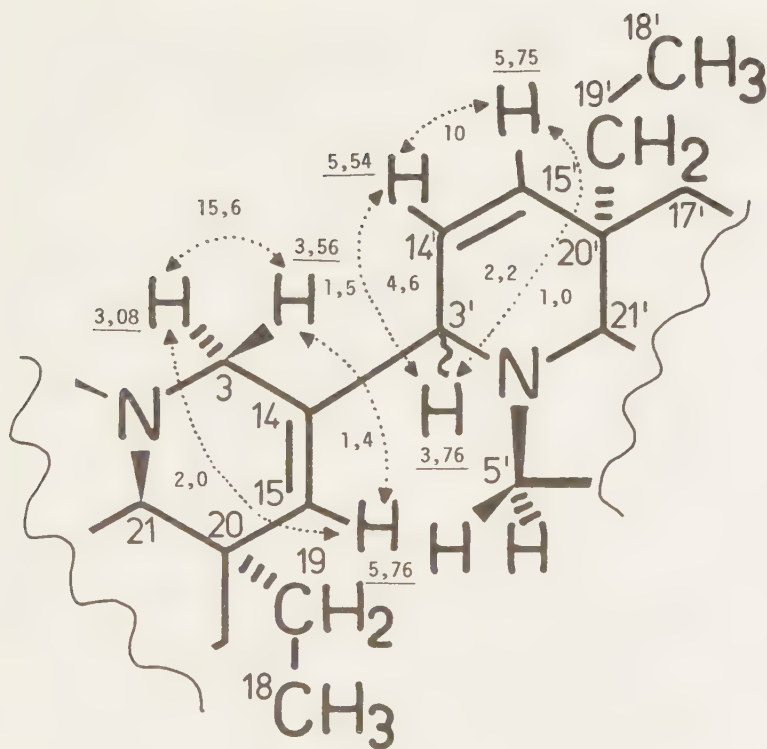


Abb. 40 : Ausschnitt aus dem Voafrin.

Die unterstrichenen Zahlen geben die chemische Verschiebung an, die Zahlen auf den Pfeilen die Kopplungskonstanten (bei Angabe von 2 Zahlen steht die eine für Voafrin A, die andere für Voafrin B).

bei 2,2 und 1,0 Hz.

Bezieht man in diese Betrachtungen noch den Einfluß des Dieder Winkels auf die vicinale und allylische Kopplung mit ein, so kann man bei Voafrin A für das H -C3' eine α -Stellung (senkrecht zu der von der Doppelbindung fixierten Fläche) und bei Voafrin B eine β -Stellung (in der Ebene der Doppelbindung) formulieren.

Diese Untersuchung konnte also sowohl die Frage nach der Verknüpfungs-

stelle als auch die nach der Stereochemie beantworten.

Bei dem Voaftrin A handelt es sich um ein 14-(3'- β -Tabersonyl)tabersonin in (3'R)-Konfiguration, Voaftrin B ist ein 14-(3'- α -Tabersonyl)tabersonin mit (3'S)-Konfiguration (vergl. Abb. 41).

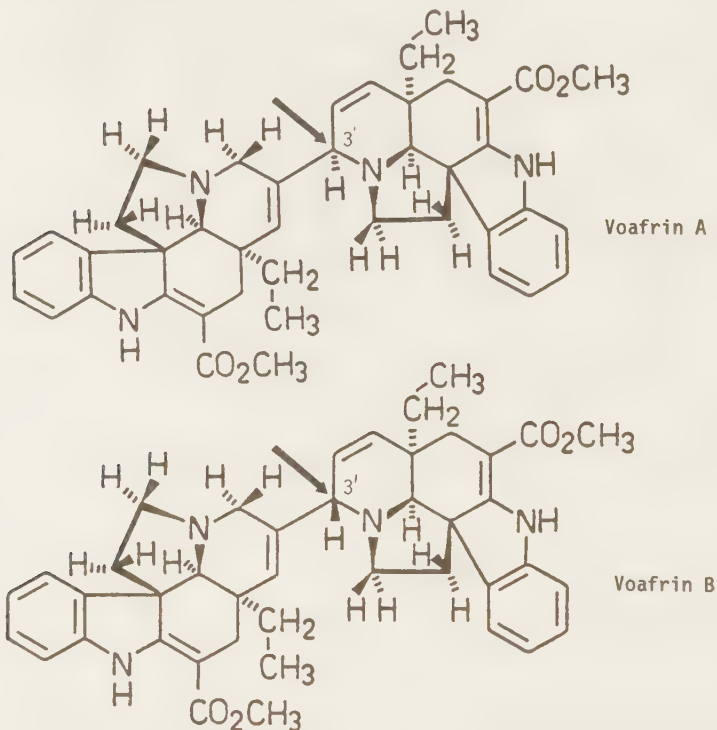


Abb. 41 : Voaftrin A und Voaftrin B zwei Bisindolalkaloide aus Voacanga africana.

Betrachtet man die Moleküle am Dreiding-Modell, so fällt auf, daß die beiden Verbindungen in ihrer räumlichen Struktur grundlegend verschieden sind :

Im Voaftrin A liegt das α -ständige Proton an C3' in einer quasi axialen Orientierung vor (vergl. Diskussion oben) und die zweite Tabersonin-Einheit nimmt eine quasi äquatoriale Orientierung ein. Es ergeben sich nur ganz schwache Einflüsse untereinander, da beide Einheiten voneinander wegweisen. Die chemischen Verschiebungen und auch die Kopplungskonstanten sind denen des Tabersonins sehr ähnlich.

Im Voafrin B nimmt der Substituent an C3' eine quasi axiale Orientierung ein. Dadurch wird die Konformation der Einheit II stark verändert, was einen entsprechenden Einfluß auf die chemischen Verschiebungen und die Kopplungskonstanten der jeweiligen Protonen hat. Besonders auffällig ist dieser Effekt auf die Protonen der Tryptamin-Brücke (H2 -C5, H2 -C6 und H2 -C5', H2 -C6'), deren chemische Verschiebungen sich teilweise bis um 0,3 ppm zum niedrigeren Feld hin verändern. Das spricht für eine signifikante Änderung der Konformation des C-Ringes. Ein ähnlicher Effekt tritt bei H -C21' auf (vergl. Tabelle 14).

Proton	Voafrin A	Voafrin B
HB -C3	3,56 (dd 15,6;1,4) ^{a)}	3,82 (brd 15,4) ^{a)}
H _α -C3	3,08 (dd 15,6;2,0)	3,83 (brd 15,4;2,0)
HB -C3'		3,99 (brd 4,6;1,0; 1)
H _α -C3'	3,76 (ddd 2,2;1,5; 1)	
HB -C5	3,02 (ddd 8,5;6,2;1,4)	3,05 (ddd 9,5;7,0;2,0)
HB -C5'	3,03 (ddd 8,5;6,2;1,4)	3,20 (ddd 8,0;8,0;7,0)
H _α -C5	2,7 ^{b)}	2,88 (ddd 9,5;8,5;5,2)
H _α -C5'		3,08 (ddd 8,0;8,0;4,9)
HB -C6	2,0 ^{b)}	2,05 ^{c)}
HB -C6'		2,07 (ddd 12,0;8,0;8,0)
H _α -C6	1,70 (dd 11,4;4,2)	1,81 (ddd 12,0;5,2;2,0)
H _α -C6'	1,74 (ddd 11,4;4,8;1,4)	1,98 (ddd 12,0;7,0;4,9)
H -C9	7,34 (dd 7,6;1,2)	7,36 (dd 7,6;1,2) ^{d)}
H -C9'	7,35 (dd 7,6;1,2)	7,45 (dd 7,6;1,2)
H -C10	6,88 (ddd 7,6;7,6;1,4)	6,86 (ddd 7,6;7,6;1,0) ^{d)}
H -C10'	6,88 (ddd 7,6;7,6;1,4)	6,88 (ddd 7,6;7,6;1,0)
H -C11	7,15 (ddd 7,6;7,6;1,2)	7,13 (ddd 7,6;7,6;1,2) ^{d)}
H -C11'	7,16 (ddd 7,6;7,6;1,2)	7,12 (ddd 7,6;7,6;1,2)
H -C12	6,99 (dd 7,6;1,4)	7,03 (dd 7,6;1,0) ^{d)}
H -C12'	7,00 (dd 7,6;1,4)	7,04 (dd 7,6;1,0)
H -C14'	5,54 (dd 10,0;1,5)	5,82 (dd 10,2;4,6)
H -C15	5,76 (ddd 2,0;1,4; 1)	5,71 (ddd 2,0;1,0; 1)
H -C15'	5,75 (dd 10,0;2,2)	5,93 (dd 10,2;1,0)
HB -C17	2,49 (d 15,0) ^{d)}	2,40 (d 14,9)
HB -C17'	2,59 (d 15,0) ^{d)}	2,21 (d 15,1)
H _α -C17	2,58 (dd 15,0;1,8) ^{d)}	2,54 (dd 14,9;1,7)
H _α -C17'	2,62 (dd 15,0;1,2) ^{d)}	2,64 (dd 15,1;1,6)
H3 -C18	0,66 (t 7,5)	0,63 (t 7,5)
H3 -C18'	0,69 (t 7,5)	0,71 (t 7,5)
H2 -C19		
H2 -C19'	0,7-1,9 (m)	0,85-1,1 (m)
H -C21	2,73 (d 1,8) ^{d)}	2,78 (brd 1,7)
H -C21'	2,83 (d 1,2) ^{d)}	3,17 (brd 1,6)
COOCH ₃	3,70 (s)	3,67 (s)
	3,72 (s)	3,70 (s)
N-H	9,33 (s)	9,33 (s)
N-H	9,34 (s)	9,41 (s)

Tabelle 14 : ¹H-NMR-spektroskopische Daten von Voafrin A und Voafrin B (weiter siehe nächste Seite)

Voafrin A gemessen bei 300 MHz; 0,02 M Lösung

Voafrin B gemessen bei 500 MHz; 0,02 M Lösung

- a) Die chemischen Verschiebungen werden in ppm bezogen auf TMS angegeben, in den Klammern: Multiplizitäten mit den Kopplungskonstanten in Hz.
- b) Multipllett mit dem Mittelpunkt bei den angegebenen Wert.
- c) Überlagert von Lösungsmittelsignal.
- d) Zuordnung durch Doppelresonanz-Experimente.

7.4.3. Anwendung der 2D-NMR-Methode

Ein besonders problematischer Fall bei der Zuordnung waren die 8 Protonen der beiden Tryptamin-Brücken (H₂-C₅, H₂-C₆ und H₂-C_{5'}, H₂-C_{6'}). Das komplexe Aufspaltungsmuster (ddd) und die sehr ähnlichen chemischen Verschiebungen für die Protonen an C₅/C_{5'} und C₆/C_{6'} machten im eindimensionalen Spektrum eine exakte Zuordnung annähernd unmöglich. Durch die Anwendung der 2D-NMR-Technik konnte dieses Problem gelöst werden.

Abb. 42 zeigt das 2D-COSY-400-MHz-NMR-Spektrum von Voafrin B. Die Auftragung erfolgte als Konturplot.

Durch den Vergleich mit den Werten des Tabersonins (vergl. III 7.4.2.) konnten die jeweiligen chemischen Verschiebungen der Protonen an C₅/C_{5'} und C₆/C_{6'} zwischen 2,7 - 3,2 und 1,8 - 2,0 ppm eingegrenzt werden. Damit war es möglich den Bereich, in dem die Resonanzen der interessierenden Protonen auftreten, einzugrenzen.

Der nächste Schritt war festzustellen, welche Kopplungen zu erwarten sind. Wie schon oben beschrieben finden Aufspaltungen statt zwischen:

H_α-C₅ und H_β-C₅

H_α-C₅ und H_α-C₆

H_α-C₅ und H_β-C₆

Betrachtet man nun das 2D-¹H-NMR-Spektrum, so erkennt man auf der Diagonalen das übliche 1D-¹H-NMR-Spektrum. Alle Peaks, die sich außerhalb der Diagonalen befinden, stellen eine homonucleare ¹H-¹H-Kopplung dar (vergl. II 6.4.). Durch Verbinden der Peaks auf der Diagonalen und der Cross-Peaks kann man alle Signale eines Kopplungsbereiches erfassen. In diesem Fall erkennt man bei 2,88 ppm ein Signal von H_α-C₅. Verbindet man den dazugehörigen Cross-Peak mit der Diagonalen, so kommt man zu H_β-C₅ (vergl. Abb. 42).

Beide Signale müssen je eine Kopplung mit H_α-C₆ und H_β-C₆ zeigen. Eine waagrechte Linie zu den weiter außen liegenden Cross-Peaks und

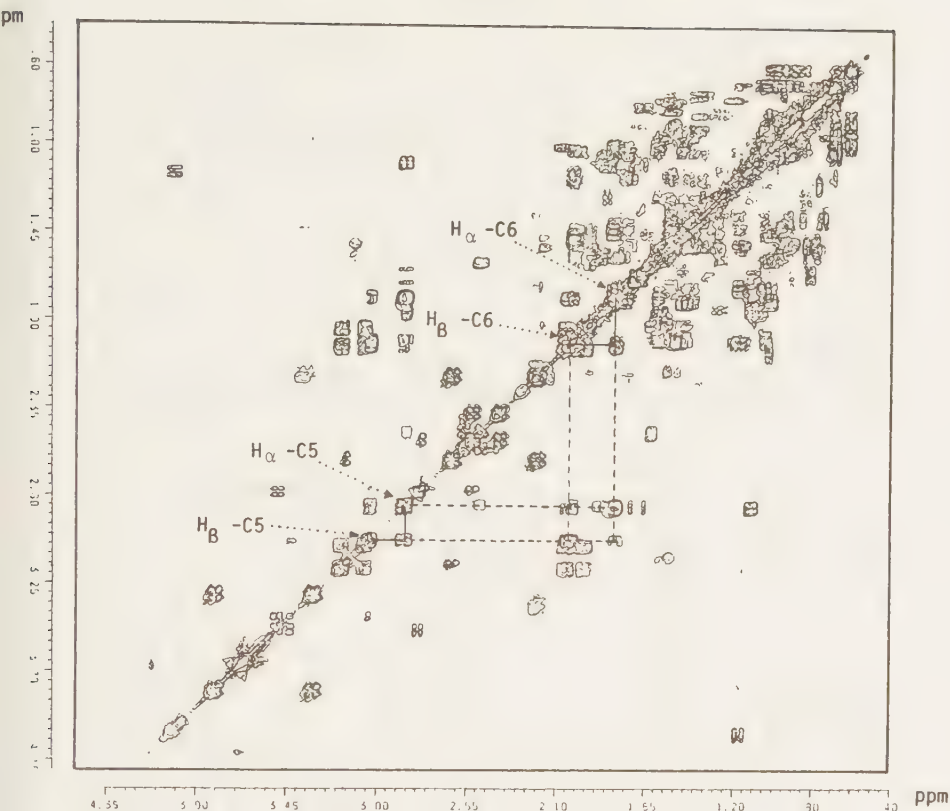


Abb. 42 : 2D-COSY-400 MHz-NMR-Spektrum von Voafirin B

— : geminale Kopplung

- - - : vicinale Kopplung

Alle Kreuzungspunkte stellen eine Cross-Peak und damit die Kopplungen mit den anderen Protonen dar.

Die Verlängerung der Linien auf die δ -Skala bringt die zugehörigen ppm-Werte.

eine senkrecht dazu verlaufende Verbindung durch den Mittelpunkt des Cross-Peaks wieder zur Diagonalen, führt zu den jeweiligen Kopplungspartnern. Auf diese Weise konnten die Protonen der Tryptamin-Brücke eindeutig zugeordnet werden (vergl. Abb. 43).

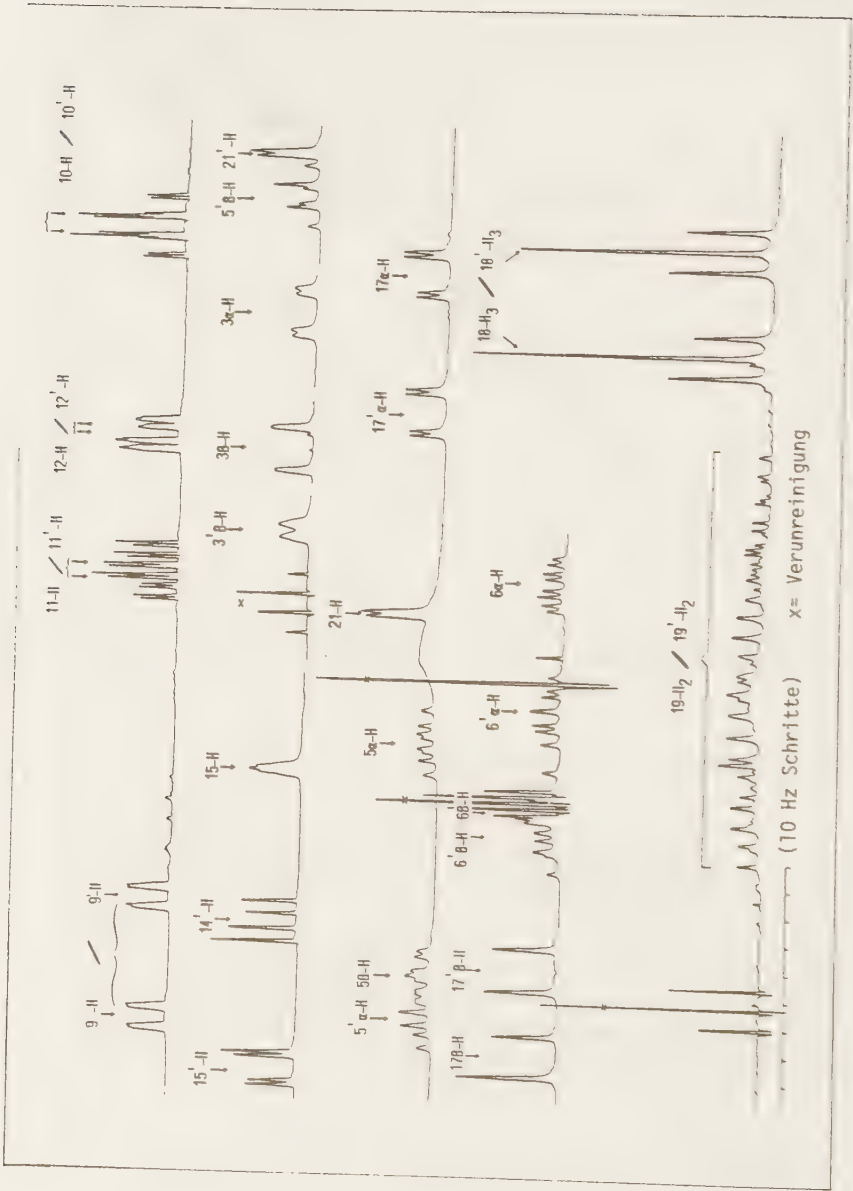


Abb. 43 : Teil des 500 MHz ^1H -NMR-Spektrums von Voafirin B in (CD_2Cl_2)

Das ^{13}C -NMR-Spektrum von Voafrin B zeigt in weiten Teilen eine große Übereinstimmung mit dem des Tabersonins.

Unterschiede treten erwartungsgemäß bei den C-Atomen der Verknüpfungsstelle auf, deren Resonanzen zum tieferen Feld hin verschoben sind. Interessanterweise ist das C21'-Signal ebenfalls zum tieferen Feld hin verschoben. Die Konformationsänderung durch die axiale Orientierung der Tabersonin-Einheit I macht sich auch hier bemerkbar und steht in vollständiger Übereinstimmung mit den bei dem Protonenspektrum diskutierten Ergebnissen.

Kohlenstoff	Voafrin B		Tabersonin
2 / 2'	166,7	165,9	166,7
3'	59,7		
3	52,9		50,3
5 / 5'	50,9	50,9	50,8
6 / 6'	43,8	45,4	44,3
7 / 7'	56,8	56,3	55,0
8 / 8'	139,9	139,1	137,8
9 / 9'	122,9	122,4	121,4
10/10'	121,5	121,3	120,5
11/11'	128,4	128,4	127,6
12/12'	110,4	110,4	109,2
13/13'	144,6	144,6	143,1
14/14'	136,8	133,9	124,8
15/15'	130,8	126,6	132,9
16/16'	92,2	91,1	92,2
17/17'	28,9	28,6	26,7
18/18'	8,3	8,0	7,3
19/19'	31,9	31,1	28,4
20/20'	41,1	38,6	41,2
21/21'	71,0	66,0	66,9
22/22'	168,6	168,6	168,8
23/23'	52,0	51,9	50,8

Tabelle 15 : ^{13}C -NMR-spektroskopische Daten von Voafrin B und im Vergleich dazu die Daten von Tabersonin (nach WENKERT et al. 1973).

7.4.3. Untersuchungen zu einer möglichen artifiziellen Bildung von Voafrin A und Voafrin B

Das Beispiel des Metabolismus von Vindolin, bei dem durch Streptomyces griseus ein dimeres Produkt entsteht, zeigt, daß nicht nur Hydroxylierungen, Entfernung einer Methyl- oder Acetylgruppe usw. möglich sind, sondern auch Dimerisierungen erfolgen können.

Um auszuschließen, daß bedingt durch eine mögliche Infektion die Verknüpfung der beiden Tabersonin-Moleküle erfolgt, wurden die Voacanga africana Zellen und auch das Wachstumsmedium auf unterschiedliche Medien übertragen und über 30 Tage bei 35° C inkubiert.

Es konnten keine Infektionen durch Pilze, Bakterien oder ähnliches festgestellt werden.

Eine weitere Möglichkeit für eine artifizielle Bildung besteht bei der Aufarbeitung des Gewebes und der Herstellung des Alkaloidrohextraktes. Um eine mögliche Dimerisierung an dieser Stelle detektieren zu können, wurde Tabersonin am aromatischen Ring mit ^3H radioaktiv markiert und vor der Alkaloidaufarbeitung dem Gewebe zugegeben. Die nach der Trennung des Alkaloidrohextraktes erhaltenen Voafrine waren nicht radioaktiv markiert.

Damit kann eine artifizielle Bildung von Voafrin A und Voafrin B ausgeschlossen werden.

Indiz für eine enzymatisch katalysierte Reaktion ist einmal die Tatsache, daß auch in anderen Kulturen Tabersonin gebildet wird, die Voafrine aber nicht nachweisbar waren; zum anderen bilden einige Voacanga Kulturen kleine Mengen Tabersonin und viel der dimeren Substanzen. Auch lassen sich bei verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Verhältnisse der beiden Voafrine auffinden (Voafrin A : Voafrin B = 1 : 1, oder auch 1 : 2,5).

7.5. Optimierung der Bedingungen für die Alkaloidproduktion

Wie schon unter III 7.3.1. beschrieben, konnten zusätzlich zu der Bande, die die Hauptalkaloide enthielt, noch zwei weitere Banden eluiert werden. Die Substanzmenge reichte aber für eine Identifizierung dieser Alkaloide nicht aus. Daher sollte versucht werden durch Überführung des Gewebes in andere Medien, oder durch die Veränderung des Mediums zu höheren Alkaloidausbeuten zu gelangen.

7.5.1. Anwendung der HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung der Alkaloide aus V. africana.

Die HPLC-Methode ist für eine exakte quantitative Analyse von Alkaloidmischungen jedem anderen chromatographischen Verfahren weit

überlegen. Einerseits ist es möglich durch die Auswahl geeigneter Fließmittelsysteme hervorragende Trennungen zu erreichen, andererseits kann eine große Anzahl von Proben in vergleichsweise kurzer Zeit analysiert werden.

Für Rohextrakte von Voacanga africana wurde ein Trennsystem entwickelt, das die 3 am wenigsten polaren Verbindungen trennt : Voafrin A, Voafrin B und Tabersonin.

Säule	analytische Säule von Merck (0,4 x 25 cm)		
Säulenmaterial	RP 18		
Fließmittel	Acetonitril/Wasser (10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$)		
Gradient	85:15 (Acetonitril/Wasser) $\xrightarrow{10\text{min}}$ 99:1 $\xrightarrow{10\text{min}}$ 99:1		
Äquilibration	5 min		
Flußrate	1 ml/min		
Probenvolumen	20 µl		
Detektion	328 nm		

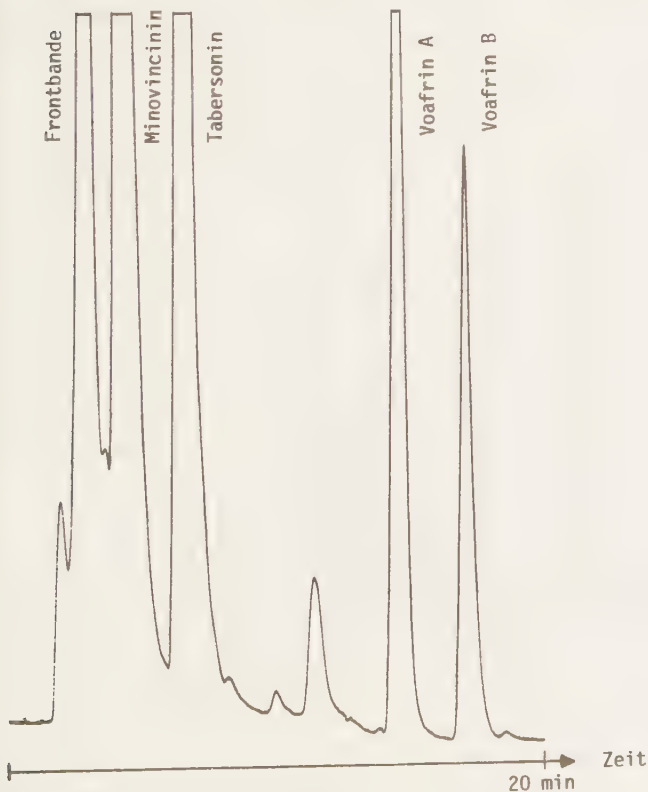


Abb. 44 : Trennung der apolaren Alkaloide aus Voacanga africana

Zur quantitativen Bestimmungen wurden Lösungen definierten Gehaltes hergestellt und als Referenz auf die Säule aufgegeben.

Retentionszeiten :

Tabersonin 6,2 min

Voafrin A 14,3 min

Voafrin B 16,9 min

7.5.2. Überführung des Gewebes in unterschiedliche Wachstumsmedien

Bei Stemmadenia tomentosa (III 6.5.) war bereits festgestellt worden, daß das Medium einen wesentlichen Einfluß auf die Alkaloidproduktion hat. Daher wurde das Voacanga africana Gewebe in unterschiedliche Medien übertragen. Nach 12 Tagen wurden die Zellen abgeerntet und ein Alkaloidrohextrakt hergestellt. In Abb. 45 ist das Ergebnis als Blockdiagramm aufgetragen.

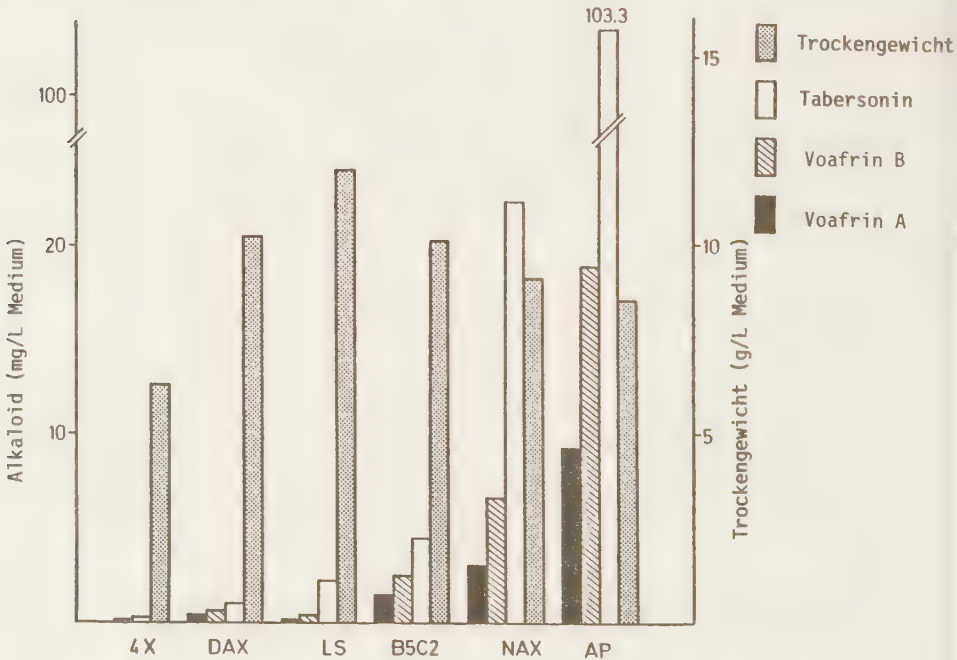


Abb. 45 : Optimierung der Alkaloidproduktion in *V. africana* Zellsuspensionskulturen durch Überführen in unterschiedliche Wachstumsmedien.

Die Unterschiede im Trockengewicht pro Liter Medium sind nur ganz gering (max. Faktor 2). Viel wesentlicher ist der Einfluß auf die Alkaloidproduktion : während beim 4X Medium nur 50 µg Voafirin B und 0,1 mg Tabersonin gebildet werden, produziert die Zellkultur nach Überführung in das AP-Medium 18,3 mg Voafirin B und 103,3 mg Tabersonin. Das bedeutet eine Steigerung für das Voafirin B um einen Faktor von annähernd 400 und für das Tabersonin von 1000.

Bei einem späteren Vergleich des AP- mit dem AP-Try-Medium konnte keine weitere Steigerung der Alkaloidproduktion festgestellt werden. Im Durchschnitt war etwa nur die Hälfte der Alkaloidmenge isolierbar, die im AP-Medium festgestellt wurde.

7.5.3. Veränderung der Phytohormone im AP-Medium

Wie in Abb. 45 zu sehen ist, zeigt auch das NAX-Medium im Vergleich zum 4X-Medium eine erhebliche Steigerung der Alkaloidmenge. In diesem Medium ist 1-Naphtylessigsäure enthalten, während das beim AP-Medium nicht der Fall ist. Daher sollte nun festgestellt werden, ob durch Zugabe von 1-Naphtylessigsäure eine weitere Erhöhung der Alkaloidproduktion im AP-Medium erreicht werden könnte.

Sowohl die Zugabe dieses Phytohormons, wie auch die schrittweise Veränderung der anderen enthaltenen Hormone brachte keine weitere Steigerung.

7.5.4. Veränderung der anorganischen Salze im Medium

Eine andere Möglichkeit eine Veränderung des Mediums vorzunehmen ist, die Konzentrationen der unterschiedlichen Salze zu variieren. So konnte die Shikonin-Produktion aus Lithospermum erythrorhizon durch die Zugabe von Cu^{2+} -Ionen um den Faktor 2,5 erhöht werden (FUJITA 1981).

Bei Voacanga africana wurden die im Medium enthaltenen Salze in ihrer Konzentration erhöht :

Wie man in der Abb. 46 a - f erkennen kann, zeigt sich weder bei dem Trockengewicht, noch bei der Alkaloidmenge eine Steigerung.

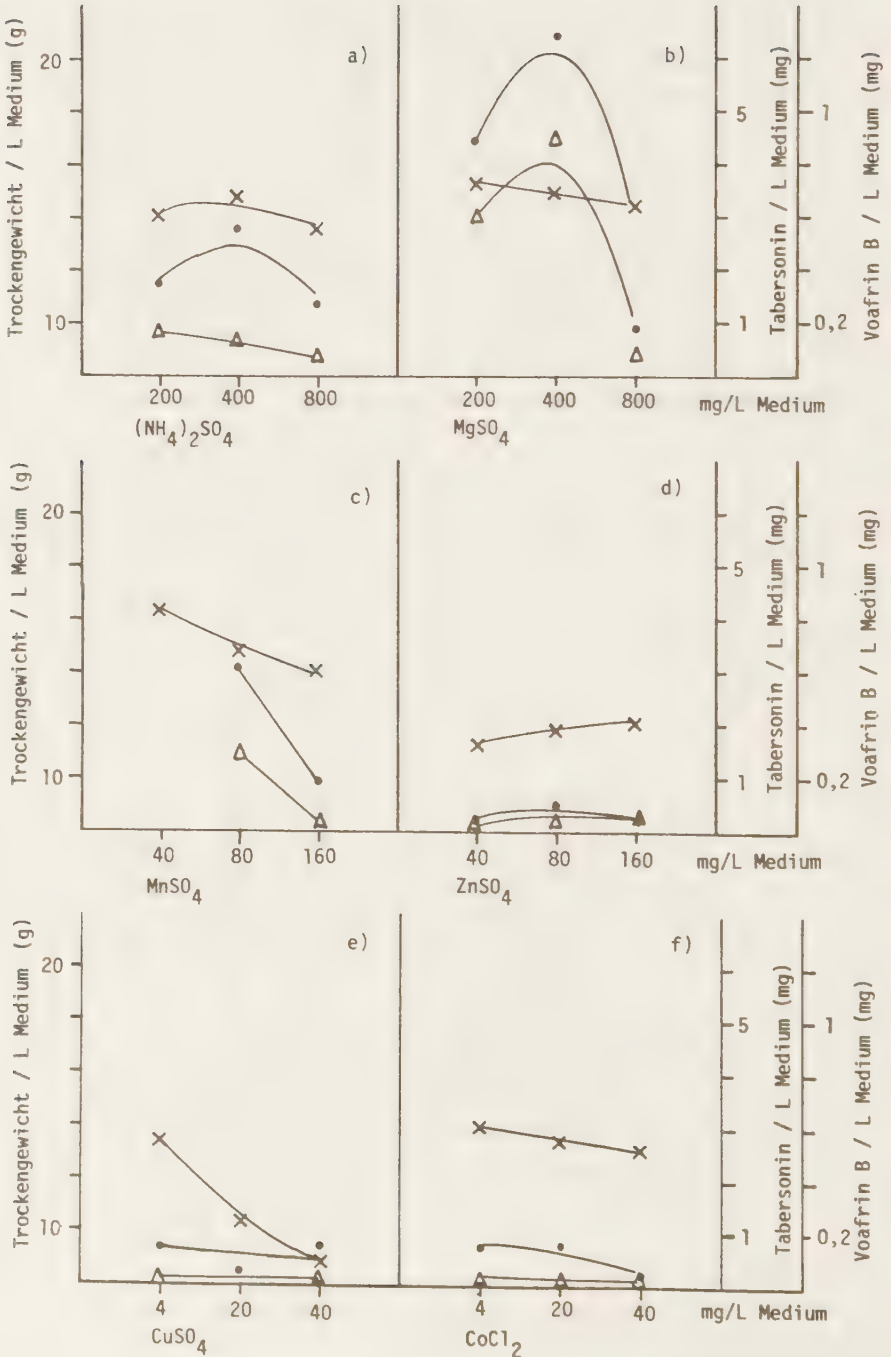


Abb. 46 a)-f) : Erhöhung der im LS-Medium vorhandenen anorganischen Salze.

- : Tabersonin mg/L Medium
—△— : Voafrin B mg/L Medium
—X— : Trockengewicht g/L Medium

Zugabe steigender Mengen von

- a) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (normalerweise im Medium nicht enthalten)
b) MgSO_4 (Normalwert : 370 mg/L Medium)
c) MnSO_4 (Normalwert : 22,3 mg/L Medium)
d) ZnSO_4 (Normalwert : 8,6 mg/L Medium)
e) CuSO_4 (Normalwert : 0,025 mg/L Medium)
f) CoCl_3 (Normalwert : 0,025 mg/L Medium)

Das gleiche Bild erhält man bei einer schrittweisen Entfernung der Salze aus dem Medium. Somit läßt sich zusammenfassend sagen, daß sowohl die Veränderung der Hormonzusammensetzung wie auch die der anorganischen Salze nicht den gewünschten Effekt einer Erhöhung der Alkaloidproduktion bringt. Die vorhandenen Medien und im ganz besonderen Maße das AP-Medium ist für die Suspensionskultur von Voacanga africana am besten geeignet.

7.6. Erneute Aufarbeitung des V. africana Gewebes und Bestimmung der Nebenalkaloide

Bei der Optimierung der Bedingungen für die Alkaloidproduktion wurde nicht nur der Gehalt der unter III 7.3. und 7.4. beschriebenen Alkaloide erhöht, sondern auch der in geringerer Menge vorkommenden Nebenalkaloide

So bot es sich an, nochmals eine Bestimmung des Alkaloidmusters vorzunehmen.

7.6.1. Aufarbeitung des Gewebes

Um die eventuell vorhandenen sehr polaren Verbindungen erfassen zu können wurden zusammen 3 kg Voacanga africana Gewebe gefriergetrocknet und mehrmals mit Methanol extrahiert. Die Methanolextrakte wurden eingeeengt und getrocknet. Es konnte insgesamt 45 g Rohextrakt isoliert werden.

30 g dieses Extraktes wurden einem sauer-basischen Ausschüttelgang unterzogen (vergl. II 7.); bei den restlichen 15 g erfolgte die Trennung mit Hilfe der DCCC-Methode (III 7.6.3.).

Die aus dem Ausschüttelgang erhaltenen Chloroformphasen wurden vereinigt und im FM 16 aufgetrennt. Es ließen sich 8 unterschiedliche Banden isolieren.

Isolierungsschema :

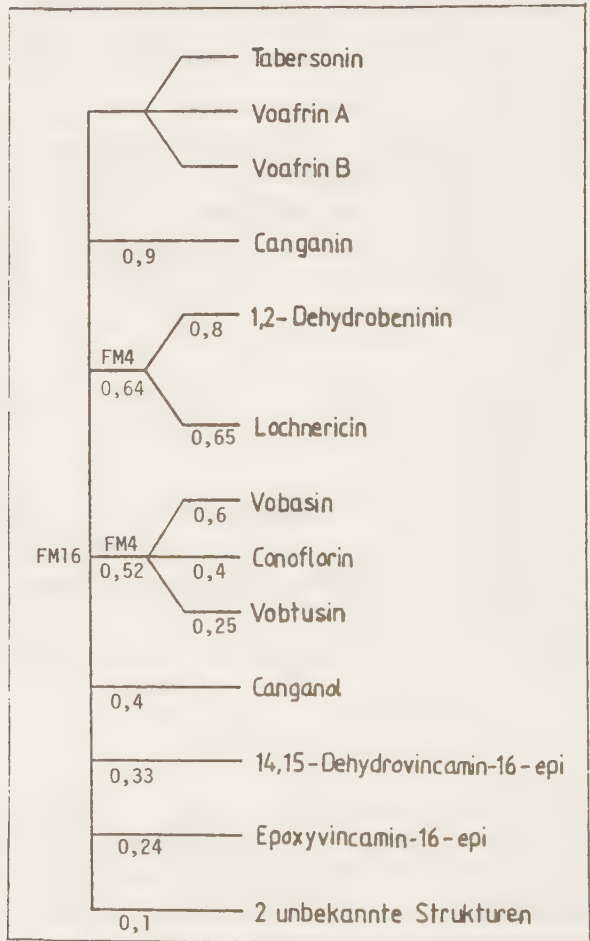


Abb. 47 : Alkaloide aus *Voacanga africana*

Banden 1 bis 8 von unten nach oben, die Zahlen geben die jeweiligen Rf-Werte an.

7.6.2. Alkaloidisolierungen und Identifizierung

Die am wenigsten polare Fraktion (Bande 8), die vollständig in der Front gelaufen ist, beinhaltet die schon oben beschriebenen Alkaloide Tabersonin, Voaftrin A und Voaftrin B. Die Alkaloide wurden im FM 7 voneinander getrennt und massenspektroskopisch identifiziert.

Bande 7 mit einem Rf-Wert von 0,9 zeigt wie die anderen beschriebenen Alkaloide des Aspidosperma-Typs eine blaue Cer-Färbung, eine blaue Fluoreszenz bei 366 nm und ein UV-Spektrum mit den Maxima bei 328, 298 und 226 nm.

Das Molekulargewicht beträgt 352, was durch DCI-Messungen bestätigt wurde ($352 \longrightarrow 353$ m/z). Zwei Fragmente fallen bei der Betrachtung des Massenspektrums besonders auf : der Basispeak bei 138 m/z und das Fragment bei 110 m/z, das durch die Abspaltung einer C_2H_4 -Gruppe entsteht. Beide Bruchstücke sind charakteristisch für die Aspidosperma-Typ-Alkaloide Beninin (GORMAN *et al.* 1966) und Vandrikin (WENKERT *et al.* 1973), deren gemeinsames Strukturelement der Tetrahydrofuran-Ring ist. Es stimmen allerdings die Molekulargewichte nicht mit der isolierten Verbindung überein.

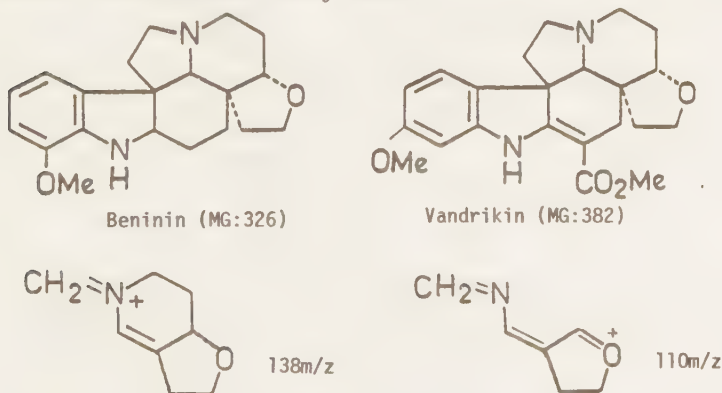


Abb. 48 : Die Alkaloide Beninin und Vandrikin und deren charakteristischen Fragmente, die mit der isolierten Verbindung übereinstimmen.

Ein Vandrikin ohne die Methoxygruppe hätte ein Molekulargewicht von 352 ($382 - 31(OCH_3) + H$). Somit bestand die Möglichkeit, daß es sich bei der unbekannten Verbindung um ein Desmethoxyvandrikin handelt.

Eine NMR-spektroskopische Untersuchung mußte das klären. Erschwerend kam hier und in den nach später beschriebenen Fällen hinzu, daß sich die vorhandene Alkaloidmenge meist nur im Bereich von 1 mg bewegte und damit das Signal-Rausch-Verhältnis sehr ungünstig war.

In dem ^1H -NMR-Spektrum (Abb. 50), der als Canganin benannten Substanz, erkennt man deutlich das NH-Signal bei 8,90 ppm als breites Singulett, die Protonensignale des Aromaten im Bereich zwischen 6,8 und 7,4 ppm und bei 3,77 ein scharfes Singulett der drei Protonen an C23 (CO_2CH_3 -Gruppe). Es ist aber kein Signal einer CH_3 -Gruppe der Ethylseitenkette zusehen, dessen Resonanz bei 0,5 - 1 ppm erscheinen müßte.

Wenn es sich bei der, bisher in der Literatur noch nicht beschriebenen Substanz tatsächlich um ein Desmethoxyvandrikin handeln sollte, so kann man für den aliphatischen Teil des Moleküls analog dem Vandrikin die in Abb. 49 angegebenen Signale erwarten.

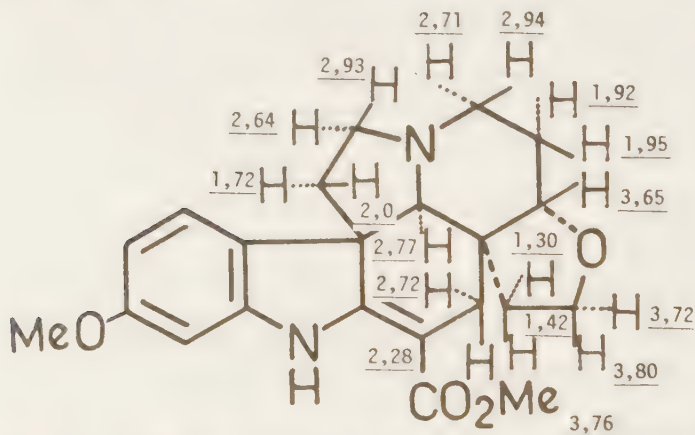


Abb. 49 : ^1H -NMR-spektroskopische Daten von Vandrikin, ohne Angaben der Multiplizitäten. Die unterstrichenen Zahlen geben die chemischen Verschiebungen an (nach LOUNASMAA et al. 1980).

Die Kopplungsgruppe H_α -C21 und H_α -C17/ H_β -C17 stellt ein $\text{A}_1\text{A}_2\text{X}$ -System dar, bei dem nur A_2 (H_α -C17) mit X (H -C21) eine Fernkopplung zeigt (Kopplungskonstante 1,0 Hz). Im NMR-Spektrum kann man deutlich die beiden Dubletts mit der großen geminalen Kopplungskonstanten von 15 Hz erkennen. H_α -C17 kann durch die kleine Aufspaltung identifiziert werden. Der ausgeprägte Dacheffekt bei 2,31 ppm (dd) und 2,76 ppm (d) bestätigt ebenfalls die Zusammengehörigkeit der beiden

Signale.

Problematischer sind die Zuordnungen der Protonen an C5 und an C6, die jeweils stark von anderen Resonanzen überlagert werden. Am leichtesten fällt die Bestimmung des Signals von H_{α} -C6, dessen Resonanz im Vandrikin bei 1,72 ppm und im Canganin bei 1,78 ppm als breites Doppelddublett zu finden ist. Die Kopplungskonstante von H_{α} -C6 und H_{β} -C6 liegt unter 1 Hz und konnte in dem vorliegenden Spektrum nicht mehr aufgelöst werden. Das Signal von H_{β} -C6 liegt bei 2,0 ppm.

Die Protonensignale von H2-C5 werden stark von den Resonanzen H2-C3 überlagert. Durch Übertragen der Kopplungskonstanten vom Vandrikin war es möglich die Kopplungsgruppen H_{α} -C5/ H_{β} -C5 und H_{α} -C3/ H_{β} -C3 aufzufinden (vergl. Abb. 50).

Die Signale H_{α}/H_{β} -C14 ergeben in dem Fünfspinsystem H2-C3, H2-C14 und H_{β} -C15 ein Multipllett, dessen Auflösung nur durch sukzessive Einstrahlexperimente möglich gewesen wäre. Die Resonanzen liegen in dem Bereich von 1,95 ppm und wurden durch Übertragen der Kopplungskonstanten aus dem Vandrikin im Spektrum sichtbar gemacht (Abb.50).

Gleiches gilt auch für die Protonen an C19 und für H_{β} -C15.

Unter Berücksichtigung der interpretierbaren Teile des NMR-Spektrums und unter Einbeziehung der massenspektroskopischen Daten kann man für das Canganin folgende Struktur postulieren :

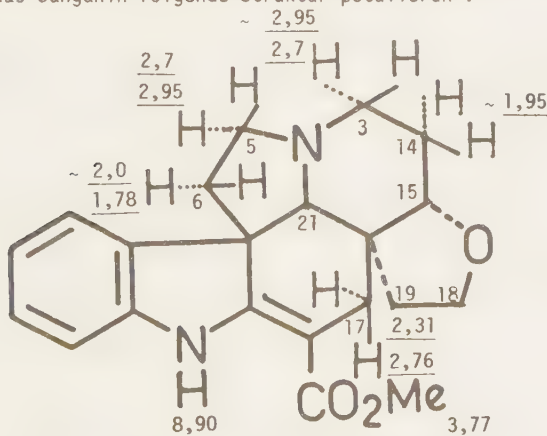


Abb. 51 : Canganin mit den zugeordneten Protonen im 1H -NMR-Spektrum, die Zahlen geben die ppm-Werte bezogen auf TMS an.

Die Bestimmung der optischen Drehung erbrachte einen negativen Drehwinkel.

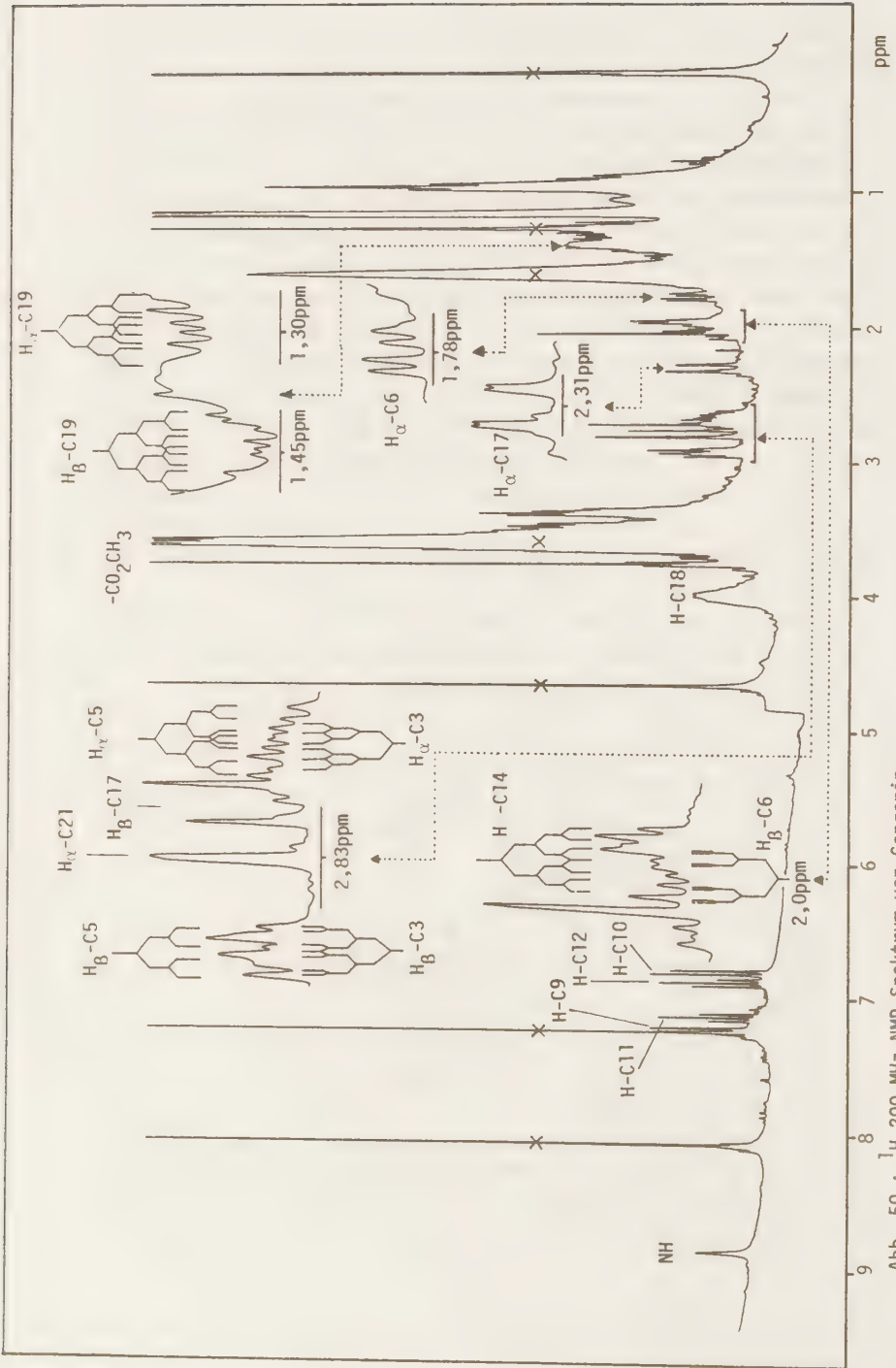
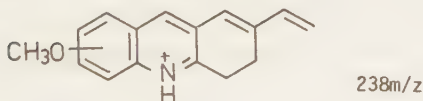


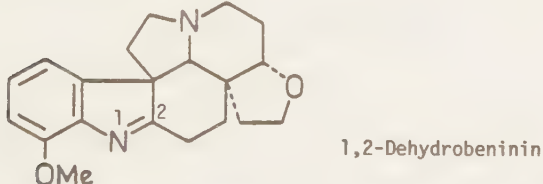
Abb. 50 : ${}^1\text{H}$ -200 MHz-NMR-Spektrum von Canganin.
Durch Übertragen der Kopplungskonstanten aus dem Vandrinin
war es möglich einige Kopplungsgruppen im Spektrum aufzu-

Bande 6 hat im FM 16 einen Rf-Wert von 0,64, bei der Rechromatographie im FM 4 wurden zwei Substanzen voneinander getrennt (Rf-Werte 0,8 und 0,65).

Die weniger polare Verbindung zeigt eine gelbliche Cer-Färbung und im UV-Spektrum die Maxima bei 306, 252 und 226 nm. Im Massenspektrum fällt zunächst der Molekularpeak bei 324 m/z besonders auf, dann die Peakgruppe bei 239 - 237 m/z mit dem für 1,2-Dehydrobeninin typischen Fragment :



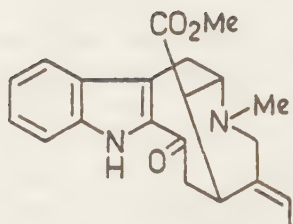
Auch die weiteren Daten stimmen mit dem erstmals aus der Wurzelrinde von Hedranthera barteri isoliertem 1,2-Dehydrobeninin überein. Dieses Alkaloid hat interessanterweise ebenfalls als Strukturelement einen Tetrahydrofuran-Ring.



Zusätzlich war in Bande 6 noch das oben beschriebene Lochnericin enthalten.

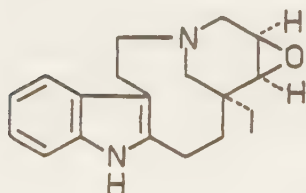
Aus Bande 5 konnte nach nochmaliger Chromatographie im FM 4 drei Alkaloide voneinander getrennt werden (Rf-Werte : 0,2; 0,4; 0,6).

Die am wenigsten polare Verbindung hat eine gelbe Cer-Färbung und ein UV-Spektrum mit den Maxima bei 315 und 239 nm. Das Massenspektrum wird überragt von dem Peak 180 m/z. Alle weiteren Ionen sind in ihrer Intensität kaum größer als 5% (352 (M^+), 239 ($M^+ - CO_2CH_3$), 194 und 122 m/z). Durch Vergleich mit anderen Massenspektren konnte dieses ungewöhnliche Spektrum dem Vobasin zugeordnet werden. Vobasin ist ein typisches Alkaloid aus Voacanga africana und wurde schon 1959 von RENNER aus der Rinde isoliert.



Vobasin

Die zweite Substanz mit dem Rf-Wert von 0,6 hat eine rote Cer-Färbung und das für den Indolchromophor typische UV-Spektrum. Auch die massenspektroskopischen Daten stimmen mit dem schon bei Tabernanthe iboga beschriebenen Conoflorin überein.

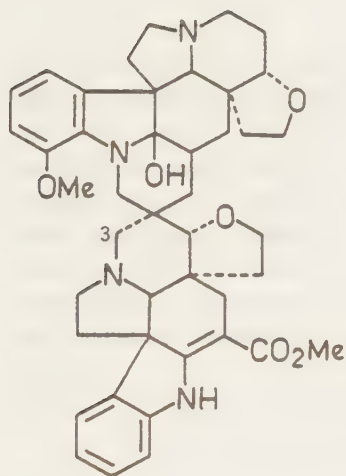


Conoflorin

Das ebenfalls noch in Bande 5 enthaltene Alkaloid hat mit Cer-Reagenz eine blaue Färbung. Im UV-Spektrum sind die Maxima bei 327, 301, 265 und 221 nm zu erkennen gewesen. Im Massenspektrum kann man den Molekularpeak bei 718 m/z sehen, was durch eine CI-Messung bestätigt werden konnte. Die weitere Fragmentierung ist in guter Übereinstimmung mit dem erstmals aus Hedranthera barteri isolierten Vobtusin (NARANJO et al. 1972). Ein für die Identifizierung wichtiges Ion ist das Bruchstück 138 m/z, das wie beim Canganin oder 1,2-Dehydrobeninin auf das Vorhandensein eines Tetrahydrofuranringes hinweist.

Das NMR-Spektrum von Vobtusin weist ein sehr charakteristisches Signal bei 5,12 ppm auf (H_{α} -C3, $J = 14$ Hz), das auch in der isolierten Verbindung zu finden war.

Somit konnte ein weiteres Bisindolalkaloid aus der Zellsuspensionskultur von Voacanga africana isoliert und identifiziert werden.



Vobtusin

Bande 4 enthält ein Alkaloid, das mit Cer-Reagenz eine blaue Färbung ergibt, das typische Aspidosperma-Typ UV-Spektrum hat und dessen massenspektroskopische Fragmentierung mit dem oben beschriebenen Minovincinin eine sehr große Übereinstimmung zeigt (vergl. Tabelle 15).

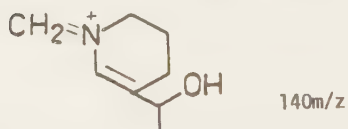
Bruchstück	Minovincinin	Canganol
M^+	354	354
$M^+ - H_2O$	+	+
$M^+ - C_2H_5$	-	+
214 m/z	+	+
140 m/z	+	+

Tabelle 16: Vergleich der Fragmentierung von Minovincinin und Canganol

Ein wesentlicher Unterschied besteht im Auftreten eines deutlichen $M^+ - C_2H_5$ Signals. Dieses Ion kann beim Minovincinin nicht auftreten, da sich an der Ethylseitenkette eine Hydroxylgruppe befindet. Das

ist bei der vorliegenden Substanz offensichtlich nicht der Fall. Gleichzeitig ist aber bei beiden Alkaloiden der Peak $M^+ - H_2O$ zu erkennen.

Das gemeinsame Auftreten des Basispeaks bei 140 m/z erleichtert die Interpretation des Massenspektrums. Wie schon bei III 7.3.2. erwähnt, entstehen bei den Alkaloiden des Aspidosperma-Typs durch eine Retro-Diels-Alder-Reaktion und nachfolgender Spaltung der C5-C6-Bindung zwei signifikante Fragmente, wobei das eine den aromatischen und das andere den aliphatischen Teil repräsentiert. Beim Minovincinin hat das Bruckstück 140 m/z folgende Struktur :



Da bei der isolierten Verbindung an der Ethylseitenkette keine OH-Funktion sitzt, das Fragment 140 m/z aber dennoch erscheint, muß sich die Hydroxylgruppe am Ring befinden.

Das bis jetzt in der Literatur noch nicht beschriebene Alkaloid wurde Canganol benannt. Eine NMR-spektroskopische Untersuchung mußte klären, an welcher Stelle des Ringes sich die Hydroxylgruppe befindet.

In Abb. 53 ist das NMR-Spektrum von Canganol zu sehen.

Auf den ersten Blick erkennt man das N-H-Signal (8,05 ppm) und die Signalgruppe der Protonen am Aromaten (7,24; 6,85; 7,1 und 7,00 ppm), weiterhin bei 3,69 ein scharfes Singulett der drei Protonen an C23 ($-CO_2CH_3$) und im hohen Feld bei 0,57 ppm das Triplett von H3 -C18 der Ethylseitenkette.

Es lassen sich keine Signale für ein $-CH_2OH$ oder $-CH(OH)-CH_3$, also für eine substituierte Ethylseitenkette finden. Das bestätigt die schon beim Massenspektrum diskutierten Ergebnisse.

Die Interpretation des 1H -NMR-Spektrums wurde zum einen durch das schlechte Signal-Rausch-Verhältnis erschwert und zum anderen durch die sehr ähnlichen chemischen Verschiebungen. Dadurch lagen die Signale überwiegend in überlagerter Form vor. Eine exakte Zuordnung konnte nur durch Einstrahlexperimente erfolgen.

Die Signalüberlagerungen machten sich, wie schon beim Voafrin diskutiert, bei den Resonanzen der Protonen an C5/C3 und C6/C14 besonders bemerkbar. Durch Einstrahlexperimente bei 3,83 und 2,60 ppm konnten sowohl die chemischen Verschiebungen der genannten Protonen als auch deren Kopplungskonstanten festgelegt werden.

Bei 2,32 ppm kann man sehr deutlich das scharfe Doppeldublett von H_{α} -C17 erkennen. Das korrespondierende Dublett mit der gleich großen Kopplung von 15 Hz ist in der Region zwischen 2,6 und 2,8 aufzufinden. Das durch H_{α} -C17 aufgespaltene Signal von H_{α} -C21 findet man ebenfalls in diesem Bereich (2,77 ppm). Durch Einstrahlen bei 2,8 ppm kann man das Signal von H_{α} -C21 entfernen, dadurch wird das Dublett von H_{β} -C17 wesentlich deutlicher und es läßt sich die Feinaufspaltung erkennen, die durch eine W-Kopplung mit H-C19 entsteht.

Der für die Stellung der OH-Gruppe entscheidende Bereich ist mit der vorgeschlagenen Struktur in Abb. 53 zu sehen.

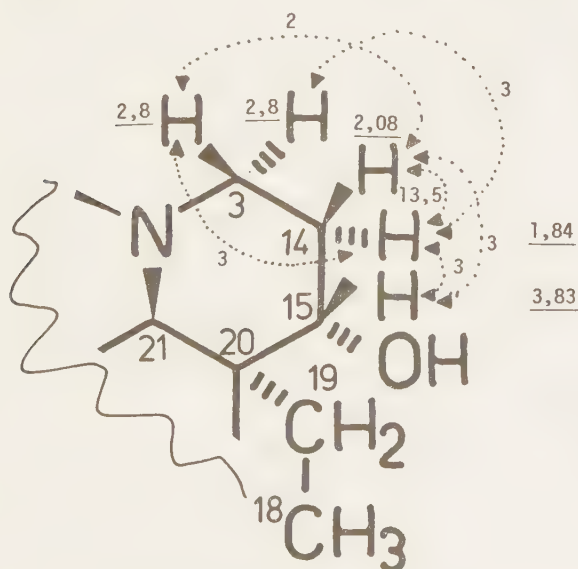


Abb. 52 : Ausschnitt aus dem Canganol
die unterstrichenen Zahlen geben die chemische Verschiebung an, die Zahlen auf den Pfeilen die Kopplungskonstanten.

Folgende Experimente führten zu der vorgeschlagenen Struktur:

Bei 3,83 ppm kann man ein Triplett erkennen (vergl. Abb. 53), das sich auf Grund der chemischen Verschiebung in der Nähe eines Sauerstoffes befinden muß. Einstrahlen bei 3,83 ppm entkoppelt ein Signal bei 2,08 und eines bei 1,84 ppm. Eine Entkopplung bei 1,84 ppm vereinfacht die Signale bei 3,83, 2,08 und die 2,8-2,9 Region.

Diese Daten führen zur Formulierung eines Fünfspinsystems mit den Protonen H_{β} -C15, H_2 -C14 und H_2 -C3 in einer Sesselform.

Bei der vorgeschlagenen Struktur handelt es sich um ein α -Hydroxy-vincadifformin, das Canganol benannt wurde.

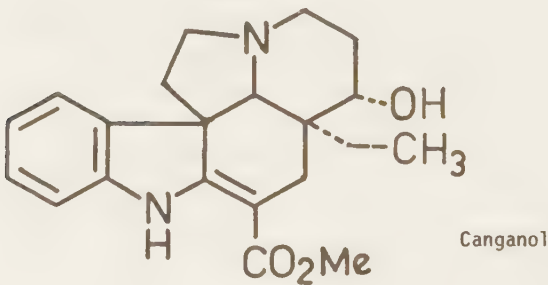


Abb. 53 von Seite 123 :

1H -200 MHz-NMR-Spektrum von Canganol.

- a) Triplett bei 3,83 ppm von H_{β} -C15 (gespreizt)
- b) H_{β} -C17 und H_{α} -C5 nach Entkoppeln bei 2,8 ppm
- c) gespreizte Region zwischen 2,7 und 2,9 ppm, in der sich die Resonanzen von H_{β} -C5, H_2 -C3 und H -C21 befinden
- d) H_{α} -C17 gespreizt
- e) Signal H_{α} -C14 nach Entkopplung bei 2,6 ppm
- f) Veränderung des H_{α} -C14 Signals nach Einstrahlen bei 3,83 ppm, hier ist auch H_{α} -C6 zu erkennen.

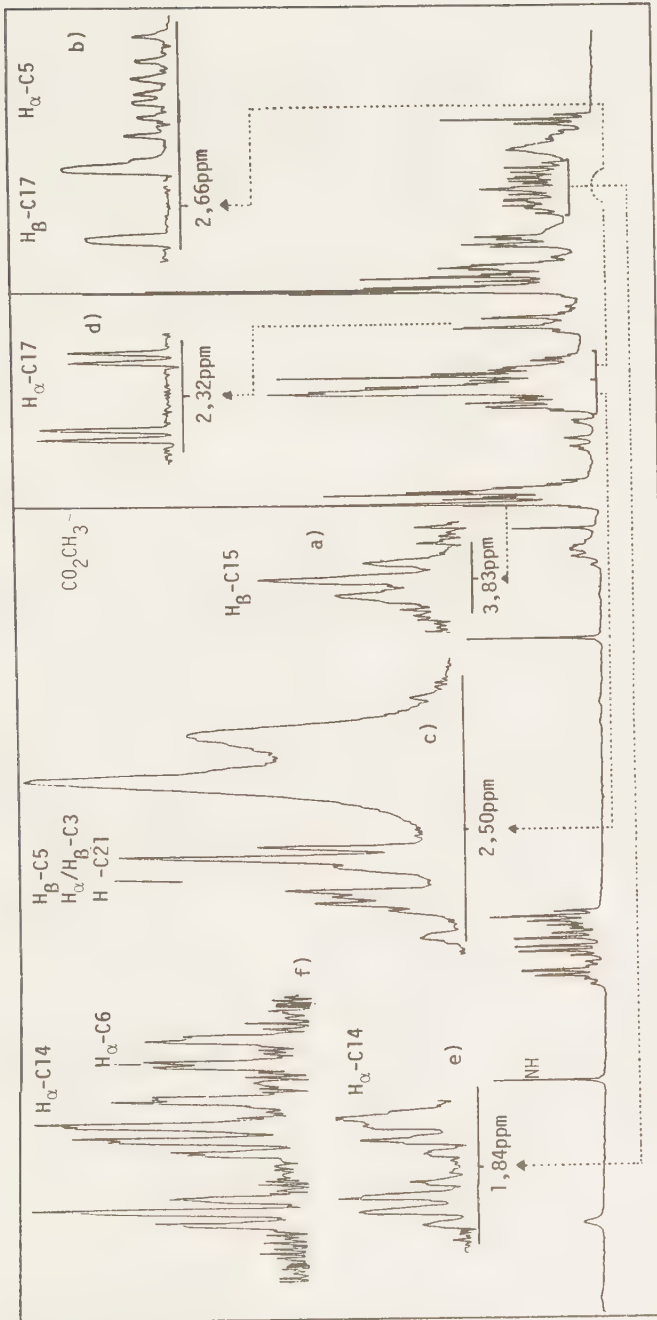


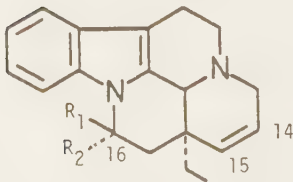
Abb. 53 : ^1H -NMR-Spektrum von Canganol isoliert aus *Voacanga africana*

Proton	Canganol
H _α -C3	2,8 (brd) a)
H _β -C3	2,8 (brd)
H _α -C5	2,60 (ddd 11,5;5;7,5) a) b)
H _α -C5	2,90 (ddd 11,5;11,5;2,0)
H _β -C6	1,78 (ddd 11,5;5;2,0) b)
H _α -C6	2,00 (ddd 11,5;11,5;7,5)
H _β -C9	7,24 (dd 7,6;1,2)
H -C10	6,86 (ddd 7,6;7,6;1,4)
H -C11	7,10 (ddd 7,6;7,6;1,2)
H -C12	7,00 (dd 7,6;1,4)
H _α -C14	1,84 (dddd13,5;3,0;3,0;3,0) b)
H _α -C14	2,08 (ddd 13,5;3,0;4,0) b)
H _β -C15	3,83 (t 3,0)
H _α -C17	2,32 (dd 15,0;2,0)
H _β -C17	2,66 (dd 15,0;1,0) b)
H _β -C21	2,80 (brd 2,0)
H3 -C18	0,57 (t)
H _α -C19	1,31-0,65 (m)
COOCH ₃	3,69 (s)
NH	8,05 (brs)

Tabelle 17: ¹H-NMR-spektroskopische Daten von Canganol
gemessen bei 200 MHz

- a) Die chemischen Verschiebungen werden in ppm bezogen auf TMS angegeben, in den Klammern : Multiplizitäten mit den Kopplungskonstanten in Hz
b) Zuordnung durch Doppelresonanz-Experimente

Bande 3 mit einem Rf-Wert von 0,33 zeigt bei 254 nm eine starke Löschung und mit Cer eine gelbe Färbung. Im UV-Spektrum konnte man die für den Indolchromophor typischen Maxima finden. Das Massenspektrum ist sehr gut strukturiert, man kann den Molekularpeak bei 352 m/z erkennen. Weitere Fragmente findet man bei 323 (M⁺-29), 305 (M⁺-29-18) und den Basispeak bei 250 m/z. Diese Daten stehen in großer Übereinstimmung mit denen des 14,15-Dehydrovincamins, das erstmals aus Vinca minor isoliert wurde (SCHITTLER et al. 1953).



R₁=OH, R₂=CO₂CH₃ : 14,15-Dehydrovincamin

R₁=CO₂CH₃, R₂=OH : 16-Epi-14,15-dehydrovincamin

Keine Aussage konnte über die Stellung der OH- bzw. CO_2CH_3 -Gruppe gemacht werden. Auch die Bestimmung der optischen Drehung führte hier, im Gegensatz zum Eburnamonin (vergl. III 5.3.2.), zu keinem Ergebnis. Hier bietet die Massenspektroskopie eine Unterscheidungsmöglichkeit. Durch Vergleich der Signalintensitäten ist es möglich Vincamin und Epivincamin zu unterscheiden. Zwei Peaks sind dabei von besonderer Bedeutung : der Molekularpeak 354 und das Fragment bei 252 m/z.

Beim Vincamin ist der Basispeak (100%) 354, während beim Epivincamin der Basispeak von 252 m/z gebildet wird (KOVACIK *et al.* 1968).

Überträgt man diese Ergebnisse auf das isolierte 14,15-Dehydrovincamin, so erkennt man bei dem Massenspektrum den Basispeak bei 250 m/z und nicht beim Molekularpeak 352. Somit kann es sich bei der isolierten Verbindung nur um das 16-Epi-14,15-Dehydrovincamin handeln.

In Bande 2 ist ein Alkaloid enthalten, das eine gelbe Cer-Färbung zeigt und im UV-Spektrum die Maxima bei 279 und 226 nm hat. Im Massenspektrum liegt der Molekularpeak bei 368 m/z. Das weitere Fragmentierungsmuster läßt nach Vergleich mit anderen Alkaloiden erkennen, daß es sich bei dieser Verbindung um ein in der Literatur noch nicht beschriebenes Alkaloid handelt. Auf Grund der Fragmentierung kann man eine Zugehörigkeit zu den Vincamin-Derivaten erkennen.

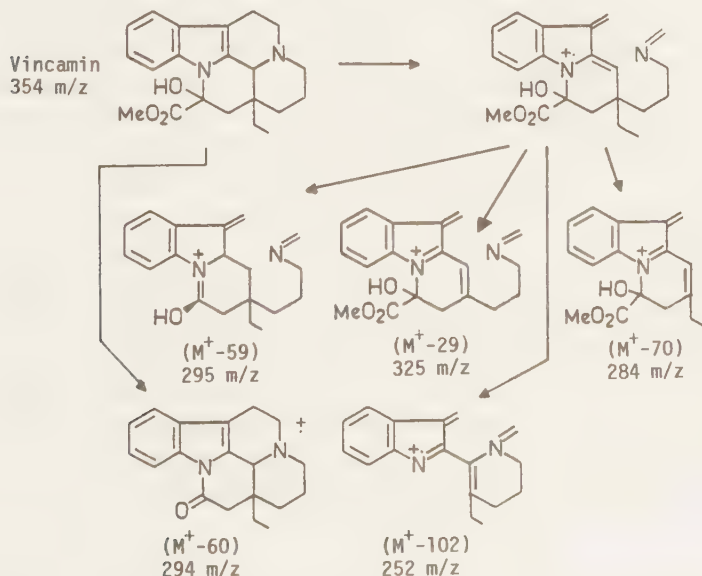


Abb. 54 : Fragmentierungsschema von Vincamin (nach HESSE 1979)

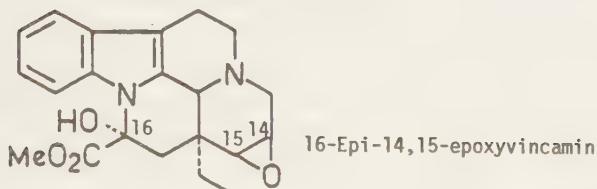
Fragment	Vincamin	unbekannte Substanz
M^+	354	368
M^+-29	+	+
M^+-59	+	+
M^+-60	+	+
M^+-70	+	-
M^+-102	+	+

Tabelle 18 : Vergleich der Fragmente von Vincamin und der isolierten Verbindung aus V. africana.

Wie man aus Tabelle 17 erkennen kann, ist die Übereinstimmung der beiden Fragmentierungsmuster sehr groß. Im Massenspektrum der unbekannten Verbindung kann man mit Ausnahme von M^+-70 jedes Fragment von Vincamin erkennen, jeweils um den Wert 14 erhöht. Wie man in Abb. 54 sehen kann, entsteht das Bruchstück M^+-70 durch die Spaltung des D-Ringes im Vincamin. Somit befindet sich an dieser Stelle des Moleküls eine Gruppierung, die das Molekulargewicht der bisher unbekannten Substanz im Vergleich zum Vincamin um 14 Masseneinheiten erhöht. Es kann sich dabei nicht um eine OH-Gruppe handeln, da eine Acetylierung nicht möglich war. Aus diesem Grunde ist nur noch eine Epoxyfunktion in Analogie zu dem Lochnericin an C14-C15 möglich. Der im Vergleich zum Molekulargewicht höhere Peak bei 266 m/z spricht wie beim oben beschriebenen 14,15-Dehydrovincamin für eine α -ständige OH-Gruppe an C16.

Durch Zusammenfassen der vorliegenden Daten kann man ein 16-Epi-14,15-

epoxyvincamin formulieren.



Die Startbande (Bande 1) enthielt zwei Verbindungen mit den Molekulargewichten von 338 und 340, deren weitere Reinigung mit Hilfe der DCCC-Methode erfolgte.

7.6.3. Anwendung der DCCC-Methode zur Trennung polarer Alkaloidfraktionen

Die flüssig-flüssig Chromatographie hat sich bei der Auftrennung und Reinigung polarer Alkaloide als sehr hilfreich erwiesen (HOSTETTMANN 1980, 1981, SCHÜBEL et al. 1984). Daher wurde versucht die, in V. africana enthaltenen sehr polaren Alkaloide, mit Hilfe der DCCC-Methode von den weiteren Alkaloiden abzutrennen.

Als Fließmittel wurden zwei gesättigte Phasen aus Chloroform, Methanol und Wasser im Verhältnis 13 : 7 : 4 ausgewählt. Ein relativ hoher apolarer Anteil hat sich bei der Trennung von Alkaloiden bewährt (HOSTETTMANN 1980).

Die Startbande und die restlichen 15 g Rohextrakt (vergl. 7.6.1.) wurden in 15 ml einer 1:1 Mischung aus mobiler und stationärer Phase gelöst und auf die Säulen aufgegeben. Es wurden insgesamt 100 Fraktionen von 11,2 ml Volumen aufgefangen (vergl. II 5.5.).

Die Fraktionen 1-16 enthielten die unter III 7.6.2. beschriebenen Alkaloide.

In den Fraktionen 33-47 war die Verbindung mit dem Molekulargewicht 338 enthalten. Insgesamt konnten 50 mg isoliert werden.

Die Fraktionen 47-50 enthielten die Verbindung mit dem Molekulargewicht von 340, von der 24 mg isoliert wurden.

Die erste Verbindung, deren Molekulargewicht bei 338 durch CI- und DCI-Messungen bestätigt werden konnte, hat im UV-Spektrum die Maxima

bei 338, 288 und 226 nm. Ein Maximum in so hohen Wellenlängenbereich findet man bei Alkaloiden mit einer vinylogenen Aldehydgruppe, wie z.B. beim Norfluorocurarin (vergl. III 4.3.2.) oder bei Alkaloiden mit einer phenolischen Hydroxylgruppe, wie beispielsweise beim Vinervin (vergl. III 3.3.1.). Wie bei den eben genannten Substanzen, zeigt sich auch bei der unbekannten Verbindung nach Zugabe von methanolischer KOH ein deutlicher bathochromer Shift ($288 \longrightarrow 298$ und $226 \longrightarrow 248\text{nm}$), der beim Neutralisieren reversibel ist.

Das massenspektroskopische Fragmentierungsmuster konnte mit keinem der bekannten Indolalkaloide zur Deckung gebracht werden. Mit Sicherheit ist die Abspaltung einer CO_2CH_3 - und einer CH_3 -Gruppe zu erkennen.

Bei einer NMR-spektroskopischen Untersuchung konnte mit großer Wahrscheinlichkeit das Signal bei 9,85 ppm einer Aldehydgruppe zugeordnet werden.

Die zweite Verbindung hat ein Molekulargewicht von 340. Auch bei dieser Substanz erfolgte die Bestätigung des Molekulargewichts durch CI- und DCI-Messungen. Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Verbindung läßt sich im UV-Spektrum (λ_{max} 277 und 208 nm) durch die Zugabe von methanolischer KOH kein bathochromer Shift erzeugen. Auch hier konnte das Massenspektrum mit keinem der bekannten Indolalkaloide zur Deckung gebracht werden.

Trotz der großen Substanzmenge war es für beide Verbindungen noch nicht möglich eine Struktur festzulegen, da noch entscheidende NMR-Experimente (DEPT-Serie, Einstrahlexperimente usw.) fehlen.

7.7. Kinetische Untersuchungen

7.7.1. Wachstumsparameter des Zellmaterials und Alkaloidbildung

Abb. 55 gibt den Verlauf der Wachstumskurve von Voacanga africana im AP-Medium und die Bildung der Alkaloide wieder. Schon nach dem zweiten Tag konnte eine Zunahme der Zellmasse festgestellt werden. Das Trockengewicht pro Liter Medium nahm in den darauffolgenden Tagen bis auf 20 g zu. Vom 16. bis zum 42. Tag nahm die Zellmasse langsam

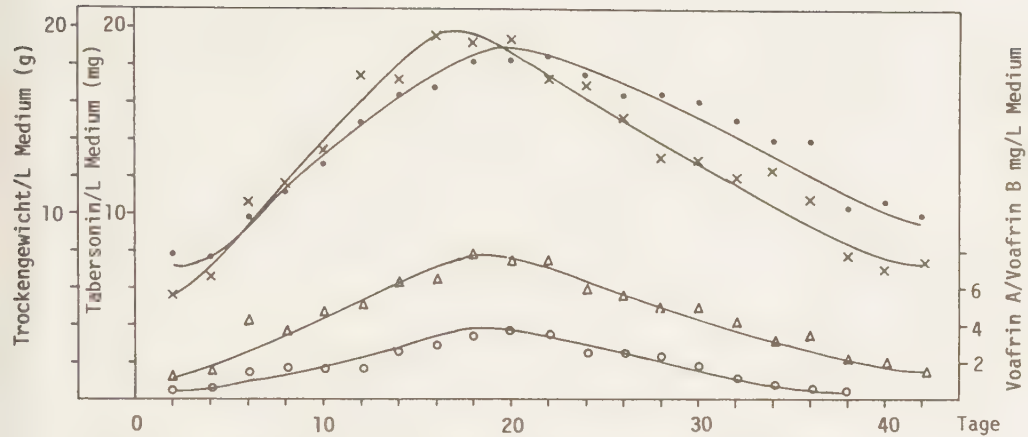


Abb. 55 : Wachstumparameter des Zellmaterials und Alkaloidbildung

- ×-×- Trockengewicht
- Tabersonin
- Δ-Δ- Voafrin B
- Voafrin A

Alle angegebenen Werte beziehen sich auf Liter Medium

aber beständig bis auf 8 g TG/Liter Medium ab. Die Verringerung des Trockengewichts verläuft jedoch längst nicht so schnell wie bei den oben beschriebenen Zellkulturen von Rhazya stricta und Stemmadenia tomentosa. Die Produktion der Alkaloide setzt parallel zwischen dem 3. und 4. Tag ein. Sowohl Tabersonin als auch die beiden Voafrine erreichen ihre höchsten Werte zwischen dem 17. und dem 21. Tag.

7.7.2. Parameter des Kulturmediums

In Abb. 56 kann man erkennen, daß der Saccharose-Verbrauch etwas verzögert einsetzt (2. Tag) und am 40. Tag die Kohlenstoffquelle verbraucht ist. Im Gegensatz zu der Suspensionskultur von Stemmadenia tomentosa und Rhazya stricta, bei denen der Zucker schon nach 17 bzw. 15 Tagen verbraucht ist, verläuft die Saccharoseabnahmen bei Voacanga africana sehr langsam. Die Leitfähigkeit zeigt ebenfalls eine abfallende Tendenz, während der pH-Wert von anfänglich 5,5 auf 6,8 ansteigt.

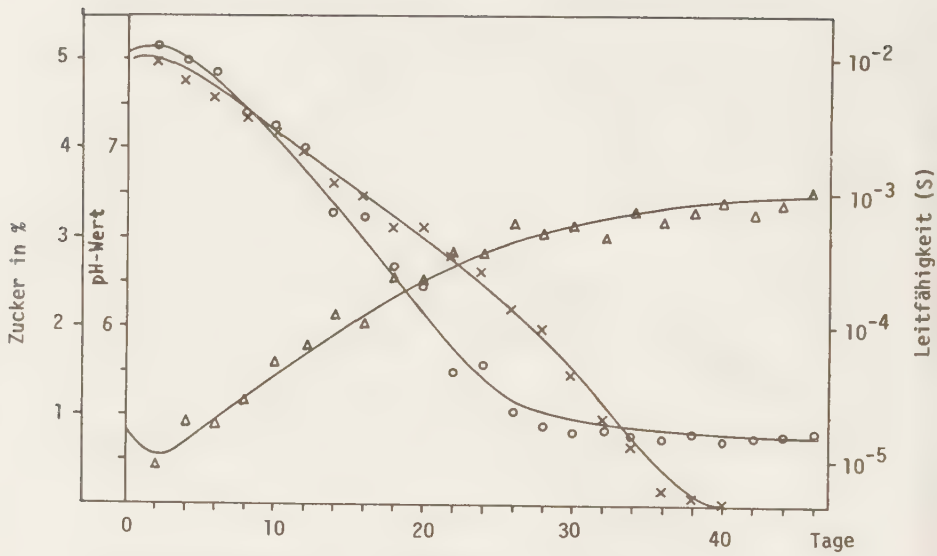


Abb. 56 : Parameter des Kulturmediums bei V. africana

- x-x Saccharose
- o-o Leitfähigkeit
- Δ-Δ pH-Wert

Verbindung	Identifizierung	Cer-Färbung	isolierte Menge mg/L Medium	Alkaloid-Typ
Tabersonin	UV, EI-MS, $[\alpha]_D^{20}$	blau	30	A
Voaftrin A	UV, EI-MS, DCI-MS, CD, IR, NMR, $[\alpha]_D^{20}$	blau	7	DA
Voaftrin B	UV, EI-MS, DCI-MS, CD, IR NMR, $[\alpha]_D^{20}$	blau	15	DA
Canganin	UV, EI-MS, DCI-MS, NMR, $[\alpha]_D^{20}$	blau	<1	A
1,2-Dehydrobeninin	UV, EI-MS	gelb	<1	A
Lochnericin	UV, EI-MS, CI-MS, Co-Chr., $[\alpha]_D^{20}$	biau	2	A
Vobasin	UV, EI-MS	gelb	1,2	Ac
Conoflorin	UV, EI-MS, Co-Chr.	rot	<1	A
Vobtusin	UV, EI-MS, NMR	türkis	1,0	DA
Minovincinin	UV, EI-MS, Co-Chr., $[\alpha]_D^{20}$	blau	7	A
Canganol	UV, EI-MS, NMR	blau	1	A
14,15-Dehydrovincamin-16-epi	UV, EI-MS	gelb	<1	A
Epoxyvincamin-16-epi	UV, EI-MS	gelb	<1	A

Tabelle 19 : Isolierte Verbindungen aus *Voacanga africana*

(A=Aspidosperma-, Ac=Acyliindol-, DA=dimeres Aspidosperma-Typ-Alkaloid)

8. Untersuchung von Rubiaceae-Zellkulturen

Rubiaceae enthalten wie die Apocynaceae Indolalkaloide monoterpenoiden Ursprungs. Im Zuge dieser Arbeit sollten die Rubiaceae Nauclaea latifolia und Uncaria gambir untersucht werden.

Bei der differenzierten Pflanze konnten in beiden Gattungen Indolalkaloide isoliert werden (HOTELLIER 1975, PHILLIPSON 1978).

In den Zellkulturen war es jedoch auch nach Überführen der Zellsuspensionen in unterschiedliche Kulturmedien (4X, LS, AP, AP-Try) bisher nicht möglich eine Alkaloidproduktion anzuregen.

9. Anhang

Zusammenfassung der physikochemischen Eigenschaften der isolierten
Alkaloide in alphabetischer Reihenfolge :

Akuammicin

Cer-Färbung : blau

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 328, 298, 226 nm

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 322 (M^+ ,16), 264 (6), 205 (10), 193 (11),
180 (8), 167 (13), 121 (100).

CI-MS m/z (rel. Int. %) : 324 (33), 323 ($M+H^+$,100), 322 (18), 108 (46).

Isoliert aus Rhazya stricta

Akuammidin

Cer-Färbung : grau

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 290, 280, 227 nm

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 352 (M^+ ,58), 351 (30), 321 (31), 293 (14),
249 (62), 236 (22), 183 (14), 182 (18), 169 (100), 168 (81).

CI-MS m/z (rel. Int. %) : 354 (35), 353 ($M+H^+$,100), 352 (25), 335 (12),
323 (5).

Isoliert aus Rhazya stricta

Apparicin

Cer-Färbung : grau

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 312 (Schulter), 302, 265 nm

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 264 (100), 249 (23), 235 (31), 222 (46),
208 (62), 194 (28), 180 (30), 167 (31), 154 (40), 143 (7),
130 (16), 128 (20), 108 (25).

Isoliert aus Rhazya stricta

Ochrosia elliptica

19,20-Epoxyapparicin

Cer-Färbung : violett-grau

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 312 (Schulter), 301, 226 nm

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 280 (90), 265 (23), 247 (8), 237 (31), 236 (33),
224 (25), 209 (28), 194 (47), 182 (76), 180 (75), 167 (100),
154 (59), 130 (46), 127 (45), 117 (23), 102 (39).

NMR-Daten : vergl. Text

Isoliert aus Ochrosia elliptica

1,2-Dehydroaspidospermidin

Cer-Färbung : orange

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 263, 222 nm

$[\alpha]_D^{20} = +240^\circ$ (Lit. 243°)

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 280 (M^+ , 80), 279 (68), 251 (51), 249 (38),
210 (100), 209 (79), 194 (68), 193 (60), 181 (50), 157 (49),
125 (54)

CI-MS m/z (rel. Int. %) : 282 (39), 281 ($M+H^+$, 100), 280 (12).

Isoliert aus Rhazya stricta

1,2-Dehydrobeninin

Cer-Färbung : gelb

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 306, 252, 226 nm

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 324 (M^+ , 74), 280 (22), 240 (12), 239 (94),
238 (100), 237 (62), 224 (25), 210 (20), 152 (14), 149 (21),
140 (33), 139 (44), 138 (34), 115 (26), 111 (23), 110 (27),
109 (22).

Isoliert aus Voacanga africana

Canganin

Cer-Färbung : blau

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 328, 298, 226 nm

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 352 (M^+ ,15), 336 (4), 251 (8), 167 (5),
138 (100), 137 (33), 110 (23).

DCI-MS m/z (rel. Int. %) : 353 ($M+H^+$,100), 352 (49), 297 (36), 296 (20),
113 (17).

NMR-Daten : vergl. Text

Isoliert aus Voacanga africana

Canganol

Cer-Färbung : blau

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 328, 298, 226 nm

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 354 (M^+ ,6), 336 (2), 323 (3), 295 (3),
222 (6), 221 (5), 194 (5), 180 (5), 168 (5), 167 (9), 140
(100), 139 (20), 110 (16).

NMR-Daten : vergl. Text

Isoliert aus Voacanga africana

Catharanthin

Cer-Färbung : ocker

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 292, 284, 226 nm

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 336 (M^+ ,12), 321 (6), 307 (9), 277 (14),
253 (6), 214 (11), 146 (22), 134 (100).

Isoliert aus Tabernaemontana divaricata

Cathenamin

Cer-Färbung : gelb

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 292, 279, 220 nm

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 350 (M^+ ,70), 349 (16), 321 (15), 289 (8),
249 (100), 221 (11), 170 (55), 169 (55), 156 (94), 145 (66),
144 (59), 143 (38), 130 (58), 129 (86), 128 (72), 117 (55),
115 (56).

Isoliert aus Ochrosia elliptica

Cathenamin

Cer-Färbung : gelb

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 292, 279, 220 nm

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 350 (M^+ , 56), 349 (15), 321 (28), 289 (6),
249 (78), 221 (12), 170 (78), 169 (62), 156 (100), 145 (62),
144 (81), 143 (46), 130 (62), 129 (95), 128 (81), 117 (56),
115 (57).

Isoliert aus Ochrosia elliptica

Condylocarpin

Cer-Färbung : blau

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 328, 296, 228 nm

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 322 (M^+ , 100), 307 (20), 291 (5), 264 (26),
263 (79), 235 (46), 180 (65), 121 (49).

Isoliert aus Stemmadenia tomentosa

Conoflorin

Cer-Färbung : rot

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 291, 284, 227 nm

$[\alpha]_D^{20} = +24^\circ$ (Lit. $+12^\circ$)

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 296 (M^+ , 51), 267 (6), 249 (13), 211 (13),
210 (12), 157 (21), 156 (41), 144 (31), 143 (35), 140 (100),
122 (47), 110 (32).

CI-MS m/z (rel. Int. %) : 298 (26), 297 ($M+H^+$, 100), 296 (22).

DCI-MS m/z (rel. Int. %) : 298 (33), 297 ($M+H^+$, 100), 296 (25).

Isoliert aus Tabernanthe iboga

Tabernaemontana divaricata

Stemmadenia tomentosa

Voacanga africana

Coronaridin

Cer-Färbung : grün

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 294, 285, 225 nm

$[\alpha]_D^{20} = -20^\circ$ (Lit. : -9°)

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 338 (M^+ , 30), 323 (10), 309 (3), 279 (8),
253 (10), 252 (11), 214 (20), 167 (52), 148 (27), 136 (100),
122 (47).

Isoliert aus Tabernaemontana divaricata
Stemmadenia tomentosa

19-OH-Coronaridin

Cer-Färbung : grün

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 294, 285, 225 nm

CD-Spektrum : vergl. Text

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 354 (M^+ , 100), 339 (64), 336 (64), 310 (16),
309 (20), 295 (8), 253 (12), 224 (12), 214 (48), 195 (16),
168 (20), 154 (27), 152 (46), 140 (48), 138 (18).

DCI-MS m/z (rel. Int. %) : 355 ($M+H^+$, 100), 337 (29).

Acetylierungsprodukt :

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 396 (M^+ , 40), 339 (7), 338 (26), 337 (100),
336 (91), 297 (7), 249 (8), 214 (12), 194 (7), 182 (9),
180 (7), 168 (17), 167 (7), 157 (5), 156 (13), 154 (10),
144 (15), 143 (13), 140 (22), 138 (8), 137 (10), 122 (20).

Isoliert aus Tabernaemontana divaricata

Eburnamin

Cer-Färbung : gelb

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 282, 276, 229 nm

$[\alpha]_D^{20} = +100^\circ$ (Lit. : $+99^\circ$)

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 296 (M^+ , 100), 295 (56), 278 (2), 267 (51),
249 (22), 226 (25), 208 (14), 206 (18), 193 (12), 180 (14),
169 (24), 168 (28), 144 (20), 143 (19).

Isoliert aus Rhazya stricta

Eburnamonin

Cer-Färbung : gelb

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 302, 296, 268, 241 nm

$[\alpha]_D^{20} = +100^\circ$ (Lit. : 105°)

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 294 (M^+ , 19), 266 (22), 265 (100), 264 (13),
237 (54), 222 (12), 209 (37).

Isoliert aus Rhazya stricta

Geissoschizin

Cer-Färbung : gelb

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 292, 279, 220 nm

CI-MS m/z (rel. Int. %) : 354 (40), 353 (M^+ , 100), 352 (20), 321 (35),
253 (12), 251 (8).

Isoliert aus Stemmadenia tomentosa

Lochnericin

Cer-Färbung : blau

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 328, 298, 226 nm

$[\alpha]_D^{20} = 440^\circ$ (CHCl_3) (Lit. : 432°)

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 352 (M^+ , 22), 322 (9), 214 (31), 138 (100),
108 (65).

CI-MS m/z (rel. Int. %) : 354 (24), 353 ($M+H^+$, 55), 323 (24), 321 (18),
220 (45), 132 (75), 107 (100).

Isoliert aus Voacanga africana

Minovincinin

Cer-Färbung : blau

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 328, 298, 226 nm

$[\alpha]_D^{20} = -400^\circ$ (CHCl_3) (Lit. : -418°)

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 354 (M^+ ,12), 336 (2), 324 (4), 309 (1),
214 (4), 140 (100), 122 (5), 110 (10).

CI-MS m/z (rel. Int. %) : 356 (35), 355 ($M+H^+$,100), 354 (22), 339 (17),
338 (28), 337 (19), 311 (10), 220 (23), 110 (25), 107 (40).

Isoliert aus Stemmadenia tomentosa
Voacanga africana

Norfluorocurarin

Cer-Färbung : blau

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 360, 299, 290, 242 nm

$[\alpha]_D^{20} = -1210^\circ$ (CHCl_3) (Lit.: -1230°)

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 292 (M^+ ,12), 277 (1), 263 (5), 259 (10),
121 (100).

Isoliert aus Ochrosia elliptica
Rhazya stricta
Stemmadenia tomentosa

Pericin

Cer-Färbung : violett

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 312 (Schulter), 302, 230 nm

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 278 (M^+ ,45), 263 (31), 250 (13), 249 (12),
235 (21), 220 (20), 209 (32), 206 (19), 194 (15), 193 (13),
180 (16), 166 (28), 154 (19), 139 (32), 122 (100).

Isoliert aus Ochrosia elliptica

Pleiocarpamin

Cer-Färbung : graubraun

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 284, 229 nm

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 322 (M^+ ,75), 307 (6), 263 (83), 234 (23),
232 (23), 218 (18), 194 (17), 181 (29), 180 (100), 168 (28),
167 (30), 155 (36), 154 (37), 144 (29), 143 (23), 131 (71),
108 (91).

Isoliert aus Ochrosia elliptica
Stemmadenia tomentosa

Strictosidinlactam

Cer-Färbung : gelb

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 282, 279, 220 nm

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 498 (M^+ , 2), 336 (8), 335 (4), 319 (4), 267 (30),
266 (100), 265 (79), 237 (23), 236 (32), 235 (48), 207 (20),
171 (42), 169 (39), 144 (44), 143 (37).

DCI-MS m/z (rel. Int. %) : 499 ($M+H^+$, 7), 337 (10), 269 (20), 268 (9),
267 (17), 266 (25), 265 (100), 264 (35), 163 (24), 145 (61),
144 (19), 129 (15), 128 (11), 127 (21).

Isoliert aus Rhazya stricta

Tabersonin

Cer-Färbung : blau

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 328, 298, 224 nm

$[\alpha]_D^{20} = -300^\circ$ ($CHCl_3$) (Lit. : -310°)

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 336 (M^+ , 23), 229 (19), 214 (10), 170 (10),
169 (24), 154 (8), 152 (6), 135 (100), 122 (49), 121 (30),
107 (87).

IR (KBr) (cm^{-1}) : 2930, 1720, 1662, 1600, 1460, 1425, 1370, 1240,
1195, 1165, 1100, 740.

Isoliert aus Rhazya stricta
Stemmadenia tomentosa
Voacanga africana

Tetrahydroalstonin

Cer-Färbung : gelb

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 291, 280, 272, 226 nm

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 352 (M^+ , 100), 351 (84), 337 (20), 223 (38),
209 (23), 184 (22), 169 (28), 156 (54).

Isoliert aus Ochrosia elliptica

Tetrahydrosecodin

Cer-Färbung : grünlich

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 289, 281, 215 nm

$[\alpha]_D^{20} = -8^\circ$ (CHCl₃) (Lit. : $-6,5^\circ$)

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 342 (M⁺, 2), 311 (1), 283 (1), 230 (1), 216 (1), 170 (2), 157 (1), 156 (3), 143 (1), 127 (9), 126 (100), 125 (29).

Isoliert aus Rhazya stricta

Tubotaiwin

Cer-Färbung : blau

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 326, 295, 228 nm

$[\alpha]_D^{20} = +665^\circ$ (CHCl₃) (Lit. : $+611^\circ$)

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 324 (M⁺, 45), 309 (9), 267 (31), 229 (100), 208 (22), 197 (19), 194 (34), 180 (86), 167 (88), 122 (38).

CI-MS m/z (rel. Int. %) : 326 (35), 325 (M+H⁺, 100), 324 (20), 323 (17).

Isoliert aus Amsonia ciliata

Tabernaemontana divaricata

Tabernanthe iboga

Stemmadenia tomentosa

Vallesiachotamin

Cer-Färbung : gelb

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 291, 220 nm

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 350 (M⁺, 34), 335 (8), 322 (38), 307 (27), 291 (44), 279 (100), 265 (59), 264 (59), 263 (71), 259 (31), 235 (37), 221 (70), 209 (40), 185 (82), 178 (10).

Isoliert aus Rhazya stricta

Vincadifformin

Cer-Färbung : blau

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 328, 298, 226 nm

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 338 (M^+ ,7), 253 (2), 214 (2), 124 (100).

Isoliert aus Rhazya stricta

14,15-Dehydrovincamin-16-epi

Cer-Färbung : gelb

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 290, 278, 271, 222 nm

$[\alpha]_D^{20} = +30^\circ$ (CHCl_3) (Lit. : $+30^\circ$)

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 352 (M^+ ,67), 351 (30), 334 (21), 323 (46),
305 (78), 293 (19), 284 (17), 277 (35), 266 (30), 263 (27),
250 (100), 218 (44), 170 (45), 169 (39), 168 (36), 166 (32),
144 (43), 143 (31), 132 (48), 122 (71), 121 (75).

Isoliert aus Voacanga africana

14,15-Epoxyvincamin-16-epi

Cer-Färbung : gelb

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 278, 272, 226 nm

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 368 (M^+ ,92), 367 (75), 339 (12), 309 (43),
281 (19), 267 (40), 266 (100), 265 (74), 251 (29), 238 (38),
237 (62), 224 (47), 209 (36), 208 (44), 193 (33), 181 (36),
169 (45), 168 (56), 167 (66), 154 (33), 144 (32), 143 (27),
130 (25), 121 (51), 108 (26).

Isoliert aus Voacanga africana

Vinervin

Cer-Färbung : rötlich

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 335, 280, 228 nm

$[\alpha]_D^{20} = -620^\circ$ (CHCl_3) (Lit. : -505°)

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 338 (M^+ ,16), 332 (10), 153 (38), 138 (63),
121 (100).

Isoliert aus Tabernaemontana divaricata
Stemmadenia tomentosa

Voafrin A

Cer-Färbung : blau

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 328, 298, 223 nm

$[\alpha]_D^{20} = -8^\circ$ ($c=0,62$ MeOH)

CD (MeOH, $c=0,0705$) : -24,2 (321), 0 (298), +6,33 (289), +6,45 (286),
+1,15 (262), +24,5 (235), +12,0 (217), +47,8 (202) nm

IR (KBr) (cm^{-1}) : 2930, 1730, 1670, 1610, 1470, 1440, 1380, 1240,
1190, 1170, 1115, 745.

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 670 (M^+ , 4), 349 (6), 335 (8), 229 (16), 228
(60), 227 (15), 214 (11), 213 (8), 212 (4), 203 (4), 197 (12),
196 (23), 170 (10), 169 (34), 168 (100), 167 (39), 154 (20),
141 (7), 122 (9), 121 (8), 108 (6).

DCI-MS m/z (rel. Int. %) : 727 ($M+C_4H_9^+$, 0,5), 672 (2), 671 ($M+H^+$, 4),
670 (2), 443 (3), 442 (11), 441 (6), 440 (1), 399 (9), 233
(6), 232 (23), 231 (27), 230 (80), 229 (50), 228 (12), 213
(13), 212 (7), 199 (19), 198 (100), 197 (54), 196 (8), 173 (8),
172 (30), 171 (16).

NMR-Daten : vergl. Text

Isoliert aus Voacanga africana

Voafrin B

Cer-Färbung : blau

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 328 (4,38), 298 (4,27), 223 (4,27) nm

$[\alpha]_D^{20} = -265^\circ$ ($c=0,84$ MeOH)

CD (MeOH, $c=0,0978$) : -23,2 (327), 0 (302), +7,8 (289), +1,8 (262),
+16,2 (240), 0 (220), -4,35 (214), 0 (207), +2,3 (205), 0 (202) nm

IR (KBr) (cm^{-1}) : 2930, 1723, 1670, 1605, 1465, 1432, 1380, 1240,
1200, 1185, 1165, 1100, 745.

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 670 (M^+ , 2), 349 (6), 335 (6), 229 (14), 228
(59), 227 (9), 214 (10), 213 (9), 212 (5), 203 (7), 197 (12),
196 (28), 170 (12), 169 (19), 168 (100), 167 (31), 154 (12),
141 (6), 122 (9), 121 (9), 108 (7).

DCI-MS m/z (rel. Int. %) : 727 ($M+C_4H_9^+$, 1), 672 (2), 671 ($M+H^+$, 4),
670 (2), 443 (8), 442 (25), 441 (10), 233 (3), 232 (17),
231 (28), 230 (100), 229 (80), 228 (10), 214 (4), 213 (23),
212 (14), 199 (4), 198 (29), 197 (19), 172 (5), 171 (2).

NMR-Daten : vergl. Text

Isoliert aus Voacanga africana

Vobasin

Cer-Färbung : gelb

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 315, 239 nm

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 352 (M^+ , 5), 293 (4), 194 (12), 180 (100),
122 (21).

Isoliert aus Voacanga africana

Vobtusin

Cer-Färbung : blau

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 324, 299, 265, 235 nm

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 718 (M^+ , 3), 700 (1), 660 (3), 442 (2), 586
(1), 562 (3), 504 (21), 393 (17), 363 (4), 359 (4), 331 (3),
305 (5), 168 (42), 154 (37), 138 (100), 110 (9).

1H -NMR ($CDCl_3$, 250 MHz) : = 8,94 (1H, s), 7,3-6,5 (7H), 5,10 (1H, dd
 $J=14;1$), 3,75 (3H, s), 3,70 (3H, s).

Isoliert aus Voacanga africana

382 (1)

Cer-Färbung : gelb

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 282, 279, 220 nm

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 382 (M^+ , 93), 381 (100), 367 (26), 353 (5),
352 (6), 323 (8), 295 (10), 281 (18), 253 (35), 239 (11),
227 (18), 214 (16), 199 (20), 186 (58), 172 (12).

Isoliert aus Ochrosia elliptica

382 (2)

Cer-Färbung : gelb

UV (MeOH) λ_{max} : 282, 279, 220 nm

EI-MS m/z (rel. Int. %) : 382 (M^+ , 100), 381 (94), 367 (24), 352 (7),
352 (12), 323 (9), 295 (11), 281 (20), 253 (46), 239 (10),
227 (16), 214 (14), 199 (15), 186 (50), 172 (10).

Isoliert aus Ochrosia elliptica

IV DISKUSSION

Die Pflanzen sind unsere wichtigsten Arzneistofflieferanten (FARNSWORTH et al. 1976). Trotz aller Fortschritte in der organisch-synthetischen Chemie ist es wirtschaftlicher, kompliziert aufgebaute Wirkstoffe, vor allem solche mit mehreren Asymmetriezentren, aus natürlichem Material zu isolieren.

Insbesondere die Indolalkaloide monoterpenoiden Ursprungs sind von großer medizinischer Bedeutung. Erwähnt sei hier nur die blutdrucksenkende Wirkung des Reserpins und der durchblutungsfördernde Effekt des Vincamins. Weiterhin das Vincristin sowie das Vinblastin, zwei Bisindolalkaloide aus Catharanthus roseus, die in der Pflanze nur in sehr geringen Konzentrationen enthalten sind ($< 0,005\%$); beide sind als Krebstherapeutika von großer Bedeutung.

Doch trotz des großen Interesses an den Indolalkaloiden wird von den bis jetzt über 1800 bekannten Strukturen nur ein Bruchteil therapeutisch genutzt (NEUSS 1980). Das liegt zum einen daran, daß die verfügbaren Mengen dieser Verbindungen zu gering sind, zum anderen aber auch, daß technisch-ökonomische Schwierigkeiten bei der Kultivierung der alkaloidführenden Pflanzen eine leichte Zugriffsmöglichkeit erschweren.

Hier sollte die Zellkulturtechnik eine wesentliche Hilfe bei der Produktion pharmazeutisch-medizinisch wichtiger Arzneistoffe darstellen, soweit diese synthetisch nur schwer zugänglich sind. Ähnlich den Fermentationsverfahren zur Gewinnung von Antibiotika oder den Mutterkornalkaloiden (SPRECHER 1983) haben Zellkulturen wesentliche Vorteile (ZENK 1982) : Sie können unabhängig von jahreszeitlichen und witterungsbedingten Einflüssen wachsen und die Gewinnung der Arzneistoffe aus Pflanzen mit besonderen Klimaansprüchen könnte überall erfolgen. Besonders hervorzuheben ist, daß die labormäßig exakt bestimmten Bedingungen die Gewinnung eines homogenen Zellmaterials von konstanter Qualität ermöglichen.

Auf Grund der geringen Stabilität der Einzelzellen oder kleinen Zellaggregate ist der Aufschluß des Zellmaterials und die Extraktion der Alkaloide problemlos durchführbar. Dies führte zu Screening-Methoden, die ausgehend von dem Gesamtextrakt das Auffinden pharmakologisch

interessanter Verbindungen ermöglichte (KHANNA et al. 1973; VELIKY et al. 1974; MISAWA et al. 1974; ARENS et al. 1982; VAN BEEK et al. 1984).

Doch erst die genaue Kenntnis der Struktur einer wirksamen Verbindung ermöglicht einen eventuellen chemischen Synthesezugang, eine exakte pharmakologische Prüfung und die Herstellung von weiteren, vielleicht sogar weitaus aktiveren Strukturvariationen. Ein Beispiel hierfür ist das Ajmalin, das durch die Einführung einer Propylseitenkette in das Ajmalin entsteht und dessen mittlere Tagesdosis von 300 mg beim Ajmalin auf 120 mg gesenkt werden konnte (MUTSCHLER 1981).

Ein weiterer sehr wichtiger Bereich, bei dem sich die Zellkulturtechnik als außerordentlich geeignet erwiesen hat, ist die Erforschung spezieller Biosyntheseleistungen. So wurden Zellkulturen unter anderem bei der Untersuchung der Flavonoid-Biosynthese eingesetzt (HAHLBROCK 1977), zur Aufklärung der Biosynthesesequenz der Heteroyohimbinalkaloide (STÖCKIGT 1980 a, ZENK 1980), zur Biosynthese von Iridoid Glukosiden (UESATO et al. 1982), zur Biosynthese der Purin Alkaloide (BAUMANN et al. 1982), zur Biosynthese des Protoberberin Alkaloids Jatrorrhizin (RÜFFER et al. 1983) sowie auch zur Aufklärung des Biosyntheseweges der Rauwolfia-Alkaloide Sapagin und Ajmalin (PFITZNER 1984).

Durch die Bestimmung des Alkaloidmusters einer Zellkultur kann einerseits sichergestellt werden, daß die für den Biosyntheseweg charakteristischen Produkte zu finden sind, andererseits ist es aber auch möglich, neue oder synthetisch schwer zugängliche Zwischenprodukte zu isolieren, die bei einer enzymatischen Bearbeitung als Substrate eingesetzt werden können.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist es aber keineswegs sicher, daß in der Zellsuspension die gleichen Alkaloide gebildet werden wie in der differenziert wachsenden Pflanze. Daher muß, will man das biosynthetische Potential einer Zellkultur überblicken, jeweils erst ein Alkaloidmuster erstellt werden. Anhand dieses Alkaloidspektrums können dann Übereinstimmungen oder eben auch Unterschiede im Vergleich mit der differenzierten Pflanze aufgefunden werden und die identifizierten Alkaloide können in ein mögliches Biosyntheschema eingeordnet werden.

Aus den Zellkulturen von Amsonia ciliata und Tabernanthe iboga konnten beispielsweise nur 1 bzw. 2 Alkaloide isoliert werden. Der Vergleich mit der differenzierte wachsenden Pflanze zeigt, daß die Syntheseleistung der Zellkultur bei diesen Kulturbedingungen wesentlich geringer ist. So wurde aus A. ciliata nur das Strychnos-Typ-Alkaloid Tubotaiwin isoliert, während aus der Pflanze Alkaloide des Aspidosperma-, Corynanthe- und des Strychnos-Typs gefunden wurden. Aus der Zellkultur von T. iboga, von der wir annahmen, sie würde wie die differenzierte Pflanze vorwiegend Alkaloide des Iboga-Typs bilden, konnten aber nur Tubotaiwin und das Aspidosperma-Typ-Alkaloid Conoflorin extrahiert werden.

Das Indolalkaloid Tubotaiwin konnte bisher weder in Amsonia- noch in Tabernanthe-Arten nachgewiesen werden. Eine derartige Veränderung des Alkaloidspektrums einer Suspensionskultur im Vergleich zur Pflanze beruht offensichtlich darauf, daß die Produktion der Alkaloide stark von den Kulturbedingungen und dem Verhältnis der Phytohormone abhängig ist (DEUS et al. 1982; STÖCKIGT et al. 1984). Dadurch kann es wie bei den Kulturen von A. ciliata und T. iboga möglich werden, daß Verbindungen, die in der differenziert wachsenden Pflanze als Spurenalkaloide auftreten und deshalb dem Nachweis entgehen, bei der Kultivierung im flüssigem Medium als Hauptalkaloid gebildet werden.

Ganz andere Verhältnisse findet man bei der Zellkultur von Rhazya stricta. Aus dieser Kultur konnten 11 Hauptalkaloide isoliert werden, die 6 Strukturtypen angehören. 8 dieser Alkaloide gehören auch zu den bei der Pflanze beschriebenen Inhaltsstoffen : Akuammidin, 1,2-Dehydroaspidospermidin, Eburnamin, Eburnamonin, Norfluorocurarin, Tetrahydrosecodin, Vallesiachotamin und Vincadifformin. Übereinstimmungen dieser Art waren auch bei den Kulturen von Catharanthus roseus/ovalis (STÖCKIGT et al. 1980) und Rauwolfia serpentina (PFITZNER 1984) zu erkennen.

Völlig überraschend waren die Ergebnisse bei der Bearbeitung der Zellkulturen von Tabernaemontana divaricata, Ochrosia elliptica und Stemmadenia tomentosa. Der Vergleich zeigt, daß diese Suspensionskulturen in der Lage sind, bei der Produktion unterschiedlicher Alkaloid-Typen die differenzierte Pflanze bei weitem zu übertreffen. So wurden beispielsweise aus O. elliptica 10 Indolalkaloide aus 4

verschiedenen Strukturtypen isoliert, während in der Literatur über die differenzierte Pflanze nur von 4 Alkaloiden, die 2 Strukturtypen angehören, berichtet wird. Ähnliche Verhältnisse konnten bei der Zellkultur von T. divaricata gefunden werden : Die differenzierte Pflanze bildet Alkaloide des Aspidosperma- und Iboga-Typs. Aus der Suspensionskultur hingegen konnten 7 Hauptalkaloide aus 4 Struktur-Typen isoliert werden. Die Kultur von S. tomentosa enthält sogar 10 Alkaloide 5 unterschiedlicher Struktur-Typen. Bei der differenziert wachsenden Pflanze sind bisher aber nur die beiden Aspidosperma-Alkaloide Tabersonin und Stemmadenin, sowie das Iboga-Typ-Alkaloid Coronaridin bekannt. Tabersonin und Coronaridin konnten in der Zellkultur ebenfalls nachgewiesen werden, wohingegen Stemmadenin, das für Stemmadenia-Arten typische Alkaloid (COLLERA et al. 1962) nicht enthalten ist.

Während bei den Rubiaceae Kulturen bisher noch keine Alkaloidproduktion angeregt werden konnte, werden in allen 7 bearbeiteten Apocynaceae Zellkulturen Alkaloide gebildet. Damit stellen diese Suspensionskulturen eine hervorragende Quelle für Indolalkaloide monoterpenoiden Ursprungs dar.

Bei der Isolierung der einzelnen Alkaloide aus den Rohextrakten wurde für präparative Zwecke überwiegend die Säulenchromatographie mit Kieselgel verwendet. Der letzte Reinigungsschritt erfolgte aber in den meisten Fällen mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. Wie bei den einzelnen Isolierungsschemata zu erkennen ist, konnten dabei ganz hervorragende Trennungen erreicht werden.

Ein besonders wichtiger Faktor bei der Charakterisierung der isolierten Alkaloide waren die spektroskopischen Verfahren. Durch die Möglichkeit einer schnellen massenspektroskopischen Identifizierung konnten auch teilweise sehr labile Substanzen, wie das beispielsweise beim Cathenamin der Fall ist, nachgewiesen werden.

Die in den letzten Jahren erheblich verfeinerten Analysenverfahren ermöglichten auch eine Identifizierung von nur in μg Mengen vorkommenden Spurenalkaloiden. Durch ein einziges Massenspektrum können schon sehr exakte Aussagen über eine vorliegende Verbindung gemacht werden, zumal die Gruppe der Indolalkaloide massenspektroskopisch sehr gut bearbeitet ist (HESSE 1979).

Das Zusammenspiel von Dünnschichtchromatographie (teilweise auch Co-chromatographie mit Referenzalkaloiden), UV- und Massenspektroskopie führte gerade bei den nur in geringer Konzentration enthaltenen Nebenalkaloiden aus Voacanga africana zur Möglichkeit einer Strukturermittlung. Durch die Anwendung der CI-MS- und DCI-MS-Methode konnte bei Verbindungen, deren Molekularpeak bei der EI-MS-Methode nur schwer zu erkennen war, eine genaue Zuordnung des M^+ -Peaks erfolgen. Als ebenfalls sehr hilfreich erwies sich die von unserem Arbeitskreis zusammengestellte MS-Datensammlung von annähernd 1800 Indolalkaloiden.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, hat die Medienzusammensetzung einen wesentlichen Einfluß auf die Bildung von monoterpenoiden Indolalkaloiden. Ausgehend von den Suspensionskulturen von R. stricta, S. tomentosa und V. africana wurde nach Überführen des Zellmaterials in bis zu 7 unterschiedliche Medien der Einfluß auf das Wachstum und auf die Alkaloidbildung untersucht.

Bei der Bestimmung des Zellrockengewichts pro Liter Medium konnten nur geringe Schwankungen festgestellt werden. Der Vergleich der verschiedenen Medien erbrachte eine maximale Steigerung des Zellwachstums um den Faktor 2. Bei der Alkaloidproduktion hingegen traten ganz erhebliche Unterschiede auf. Während beispielsweise bei S. tomentosa in dem anfänglich verwendeten 4X Medium 5,3 mg Tabersonin pro Liter nachweisbar waren, konnten nach Überführen des Zellmaterials in das LS Medium 105,5 mg Tabersonin/L Medium gemessen werden. Diese Alkaloidmenge bedeutet im Vergleich zu dem 4X Medium eine Steigerung um den Faktor 20. Beim ebenfalls untersuchten Coronaridin belief sich diese Steigerung auf den Faktor 8. Noch drastischer fällt der Vergleich bei der Voacanga Suspensionskultur aus. Hier konnte nach Überimpfen der Zellmasse in das AP-Medium für Voafrin B eine Steigerung um den Faktor von annähernd 400 und beim Tabersonin um 1000 bestimmt werden. Solche Steigerungsraten bedeuten, daß die Produktion eines entsprechenden Alkaloids auch im Labormaßstab in größeren Mengen (g-Bereich) durchaus möglich ist. So könnte man z.B. bei S. tomentosa ausgehend von 5 Erhaltungskolben (250 ml Medium) nach Überimpfen in 10 Liter Medium innerhalb von 10 Tagen 1 g Tabersonin erhalten.

Aufbauend auf diese Ergebnisse wurde bei V. africana versucht, durch eine gezielte Veränderung des AP-Mediums zu einer weiteren Steigerung der Alkaloidproduktion zu gelangen (vergl. ZENK et al. 1977). Es

wurden die im AP-Medium enthaltenen Phytohormone in ihrer Konzentration verändert. Weiterhin wurden dem AP-Medium Hormone zugegeben, die bei den anderen untersuchten Medien ebenfalls eine Steigerung brachten, aber im AP-Medium nicht enthalten waren. Bei der Auswertung dieser Versuchsreihen konnte aber keine weitere Steigerung der Alkaloidsynthese festgestellt werden.

Die Zugabe von Kupfersalzen zum Medium führte bei Lithospermum erythrorhizon zu einer Erhöhung der Shikoninkonzentration (FUJITA 1981), auch bei einer Zellkultur von Catharanthus roseus konnte ein ähnlicher Effekt festgestellt werden (KNOBLOCH et al. 1980). Aus diesem Grunde wurde versucht, bei S. tomentosa und V. africana durch die Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an anorganischen Salzen eine Steigerung der Alkaloidkonzentration zu erhalten. Doch weder bei der Zugabe noch bei einer schrittweisen Entfernung der im Medium enthaltenen Salze konnte eine weitere Erhöhung der Alkaloidmengen erhalten werden.

Festzuhalten bleibt aber, daß erhebliche Steigerungsraten möglich sind, wenn das Zellmaterial in ein geeignetes Produktionsmedium übertragen wird.

Beim Vergleich der 3 für die Medienoptimierung untersuchten Suspensionskulturen fällt aber auch auf, daß nicht ein bestimmtes Medium für alle Kulturen gleich gut geeignet ist. R. stricta beispielsweise zeigt die höchste Alkaloidkonzentration im AP-Try Medium, S. tomentosa im LS Medium und V. africana im AP Medium.

Aus den vorliegenden Ergebnissen ist ersichtlich, daß, will man eine optimale Alkaloidproduktion, für jede Zellkultur erst ein geeignetes Medium gesucht werden muß.

Beim Vergleich der verschiedenen Medien wird aber auch deutlich, daß für ein maximales Zellwachstum eine andere Phytohormonkombination erforderlich ist, als für eine optimale Alkaloidproduktion.

Eine wesentliche Voraussetzung bei der Suche nach den besten Bedingungen für die Alkaloidproduktion ist eine schnelle und einfache Analytik, die einen großen Probendurchsatz bei vertretbaren Zeit- und Arbeitsaufwand ermöglicht.

Hier hat sich insbesondere die HPLC-Analytik bewährt, mit deren Hilfe komplexe Gemische von Indolalkaloiden unterschiedlicher Polarität aufgetrennt und auch quantitative Aussagen getroffen werden konnten.

Durch die Auswahl geeigneter Fließmittel- und Gradientensysteme konnten die Retentionszeiten der interessierenden Alkaloide in weiten Bereichen variiert und damit optimale Analysenbedingungen eingestellt werden. Der Alkaloidrohextrakt von V. africana beispielsweise enthielt außer den sehr apolaren Alkaloiden Voafrin A, Voafrin B und Tabersonin einen hohen Anteil an polaren Verbindungen. Bei der Optimierung der Medienbedingungen mußte aber ein System gefunden werden, mit dem bei kurzer Analysendauer auch quantitative Aussagen gemacht werden konnten. Das Fließmittelsystem Acetonitril/Wasser (10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) (85:15 → 99:1) führte zu einer hervorragenden Trennung von Tabersonin, Voafrin A und Voafrin B, während die polaren Alkaloide bei der verwendeten RP 18 Säule ganz in der Front liefen. Die Analysenzeit konnte dadurch auf 25 min begrenzt werden. So war es möglich, den großen Probenanfall bei der Medienoptimierung in vergleichsweise kurzer Zeit durchzuführen und auch durch Erstellen der Gewebekinetik den Aberntezeitpunkt für die Kulturen von R. stricta, S. tomentosa und V. africana zu bestimmen, bei dem die höchste Alkaloidkonzentration zu erwarten ist. Wie schon bei der Medienauswahl konnten auch hier erhebliche Unterschiede festgestellt werden. Die Zellkultur von S. tomentosa zeigt ein Maximum der Alkaloidkonzentration bereits zwischen dem 9. und dem 11. Tag, während R. stricta diesen Punkt in dem Zeitraum zwischen dem 14. und dem 16. Tag erreicht. Bei V. africana liegt der optimale Aberntezeitpunkt in dem Bereich zwischen dem 16. und dem 20. Tag.

Es konnte gezeigt werden, daß das Zellwachstum und die Alkaloidproduktion annähernd parallel verlaufen.

Bei der Isolierung der von den Zellkulturen gebildeten Alkaloide fiel auf, daß teilweise auch unbekannte Strukturen aufzufinden waren. So konnte beispielsweise aus der Zellkultur von O. elliptica ein Alkaloid eluiert werden, das in differenziert wachsenden Pflanzen bisher nicht gefunden wurde. Es handelt sich hier um eine Verbindung, die dem Apparicin sehr ähnlich ist. Die massenspektroskopische Fragmentierung der in der Literatur noch nicht beschriebenen Verbindung stimmt in weiten Bereichen mit dem des Apparicins überein. Auch die NMR-spektroskopische Untersuchung ergab große Übereinstimmungen. Durch die Anwendung der zweidimensionalen NMR-Technik war es möglich,

den Kopplungspartner von C18 der Ethylseitenkette bei 2,60 ppm zu bestimmen. Bei der Suche nach einem, für diese chemische Verschiebung geeigneten Inkrement, konnte nur eine Epoxyfunktion in Frage kommen. Durch Vergleich mit dem 1975 von MAMATAS-KALAMARAS aufgeklärten Quaternoxin, das an der Ethylseitenkette eine Epoxyfunktion enthält, konnte diese Annahme bestätigt werden. Bei der neuen Verbindung handelt es sich um das bisher noch nicht beschriebene Alkaloid 19,20-Epoxyapparicin.

Aus V. africana wurden bei einer ersten Extraktion nur 3 Alkaloide identifiziert. Erst nach der Optimierung der Bedingungen für die Alkaloidproduktion konnten auch die Nebenalkaloide in genügend großer Menge isoliert werden. Von den dann insgesamt 13 Indolalkaloiden sind 5 Alkaloide in differenziert wachsenden Pflanzen bisher nicht aufgefunden worden und werden hier zum ersten Mal beschrieben.

So z.B. das Canganin, das sich schon auf Grund der massenspektroskopischen Fragmentierung gut in die Gruppe der Alkaloide einordnen ließ, die am D-Ring einen Tetrahydrofuranring enthalten. Ausschlaggebend dafür sind die Fragment-Ionen 138 und 110 m/z, die auch in den analogen Vergleichsalkaloiden Vandrikin und Beninin vorkommen, die beide in die Gruppe der Aspidosperma-Typ-Alkaloide gehören. Bei einer NMR-spektroskopischen Untersuchung konnte ein Großteil der Protonen zugeordnet werden. Es kann daher mit großer Sicherheit angenommen werden, daß es sich bei der isolierten Substanz um das Desmethoxyvandrikin handelt, das Canganin benannt wurde,

Eine zweite neue Verbindung aus der V. africana Kultur zeigt mit dem Minovincinin eine fast identische massenspektroskopische Fragmentierung. Beim Vergleich beider Spektren wurde jedoch bei der als Canganol benannten Substanz ein etwas intensiverer M^+-H_2O - und ein $M^+-C_2H_5$ -Peak festgestellt. Die 1H -NMR-spektroskopische Messung ergab, daß es sich hier um ein 15- α -Hydroxyvincadifformin handelt, das ebenfalls in der Literatur noch nicht beschrieben war.

Bei einer weiteren, ebenfalls neuen Verbindung, konnte auf Grund der geringen Substanzmenge nur eine massenspektroskopische Untersuchung erfolgen. Durch den Vergleich des Fragmentierungsmusters von Vincamin und dem der isolierten Substanz war es möglich ein 14,15-Epoxyvincamin zu formulieren.

Bei der Bearbeitung der Zellkultur von T. divaricata deutete sich an, daß auch dimere Alkaloide aus Zellsuspensionskulturen isolierbar sind. In diesem Fall fehlte allerdings die zur Identifizierung notwendige Substanzmenge. Dimere Alkaloide sind seit dem Auffinden des als Krebstherapeutikum eingesetzten Vincaleucoblastin aus C. roseus von besonderem Interesse. In differenzierten Pflanzen wurden bis heute ca. 200 dieser Bisindolalkaloide gefunden (CORDELL 1981a). Die Zellsuspensionskultur von C. roseus Don. ist eine der am besten untersuchten Kulturen. Bis heute konnten von verschiedenen Arbeitsgruppen (KURZ et al. 1980; KUTNEY et al. 1980; STÖCKIGT et al. 1980; KOHL et al. 1980; PETIARD et al. 1982) annähernd 30 verschiedene Indolalkaloide isoliert werden. Doch trotz aller gegenteiligen Behauptungen (TAYLOR 1975; CZYGAN 1975) konnte weder das pharmakologisch bedeutsame Vincaleucoblastin noch andere dimere Alkaloide gefunden werden (HOFFMANN et al. 1983). In der vorliegenden Arbeit wird zum ersten Mal vom Vorkommen dimerer Alkaloide in Zellsuspensionen berichtet.

So konnte aus der Kultur von V. africana zum einen das natürlich vorkommende Bisindolalkaloid Vobtusin durch NMR-Spektroskopie und Vergleich mit authentischer Substanz identifiziert werden, zum anderen wurden aber auch zwei Verbindungen isoliert, die ebenfalls zu den Bisindolalkaloiden zählen und in differenzierten Pflanzen nicht aufgefunden wurden.

Diese beiden Alkaloide wurden Voafrin A und Voafrin B genannt. Durch umfangreiche spektroskopische Untersuchungen wurden die Strukturen eindeutig festgelegt, wobei auch hier die zweidimensionale NMR-Technik besonders hervorzuheben ist, mit deren Hilfe schwierige Zuordnungsprobleme gelöst werden konnten. Bei den beiden Alkaloiden handelt es sich um zwei Strukturen, die jeweils aus zwei Tabersonin-Einheiten bestehen. Wie den spektroskopischen Daten zu entnehmen ist, handelt es sich dabei nicht um das von BRUNETON und Mitarbeitern 1973 beschriebene Ditabersonin, bei dem sowohl eine andere Verknüpfung der beiden Tabersonin-Molekülen angegeben wird, als auch massenspektroskopisch deutliche Unterschiede feststellbar sind.

An diesen Beispielen kann man erkennen, daß kultivierte Zellen in der Lage sind, noch weitaus komplexere Strukturen als monomere Indolalkaloide zu bilden.

Besonders interessant erscheint hier das Auftreten von bisher un-

bekannten Verbindungen. Zwar wird in der Literatur ebenfalls darüber berichtet (OVERTON 1977, STÖCKIGT et al. 1981, ARENS et al. 1983), doch ist ein gehäuftes Auftreten wie das bei V. africana der Fall ist, bisher einmalig. Offensichtlich bleibt ein Teil des genetischen Materials der Organismen während der gesamten Lebenszeit ungenützt und wird erst exprimiert, wenn ungewöhnliche physiologische Bedingungen vorliegen, wie das bei kultivierten Zellen der Fall ist (LUCKNER et al. 1983).

Wie schon oben erwähnt, kann die Zellkulturtechnik einen wesentlichen Beitrag bei der Erforschung von Biosynthesewegen leisten. Das ist bei der Verwendung differenzierter Pflanzen in dieser Form nicht möglich (STÖCKIGT 1980a). Ein entscheidendes Kriterium für die Brauchbarkeit einer Zellkultur für Biosyntheseuntersuchungen ist das Auffinden von Alkaloidsequenzen, die sich sinnvoll in ein mögliches Biosyntheseschema einordnen lassen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Apocynaceae-Zellkulturen eine sehr gute Quelle für Indolalkaloide monoterpenoiden Ursprungs sind. Allein in den 7 untersuchten Kulturen konnten insgesamt 39 verschiedene Indolalkaloide identifiziert werden. Zählt man die von unserem Arbeitskreis bearbeiteten Kulturen von C. roseus, C. ovalis und R. serpentina (STÖCKIGT et al. 1980, STÖCKIGT et al. 1981) sowie die weiteren Arbeitsgruppen (KURZ et al. 1980, KUTNEY et al. 1980, KOHL et al. 1981, GUERITTE et al. 1983) hinzu, so sind aus Zellsuspensionskulturen schon über 70 verschiedene Indolalkaloide isoliert worden.

Anhand der hier gefundenen Alkaloide sollte nun versucht werden, mögliche Ansatzpunkte für eine spätere enzymatische Bearbeitung der entsprechenden Biosynthesewege zu finden.

So lassen sich beispielsweise bei der Zellkultur von S. tomentosa ausgehend vom Dehydrogeissoschizin - in der Zellkultur war das reduzierte Produkt nachweisbar - sowohl das isolierte Pleiocarpamin wie auch die Strychnos-Typ-Alkaloide (+)-Condylocarpin und (+)-Tubotaiwin sowie (-)-Vinervin und (-)-Norfluorocurarin gut in den von CORDELL (1974) formulierten Biosyntheseweg einordnen (vergl. Abb 57). Auffallend ist hier wie auch bei der Zellkultur von T. divaricata das gemeinsame Auftreten der Strychnos-Typ-Alkaloide, die eine posi-

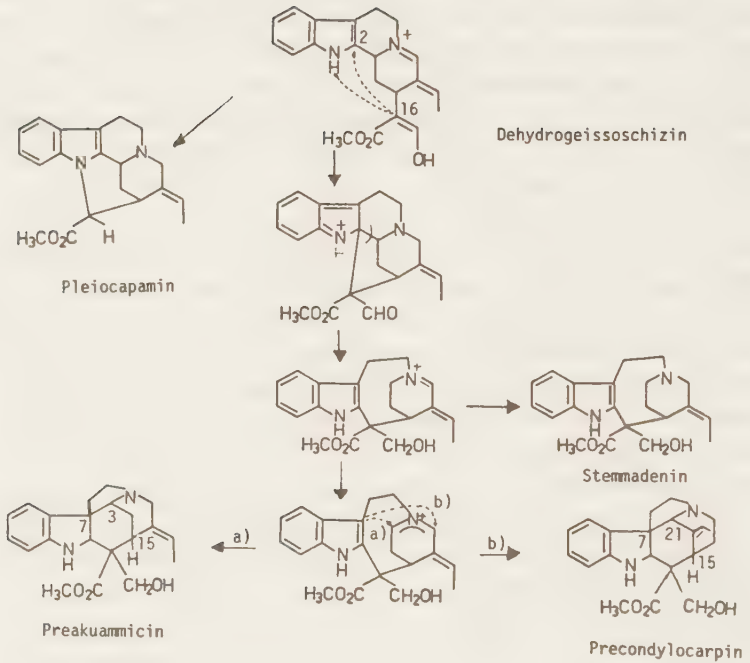


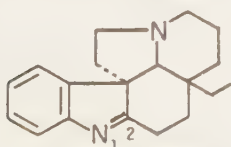
Abb. 57 : Möglicher Biosyntheseweg nach CORDELL (1974). Aus Preakuammicin kann (-)-Norfluorocurarin und (-)-Vinervin, aus Precondylocarpin kann (+)-Condylocarpin und (+)-Tubotaiwin entstehen.

tive und eine negative optische Drehung aufweisen. Obwohl zwischen beiden massenspektroskopisch große Übereinstimmungen feststellbar sind, sind sie von der Struktur her sehr unterschiedlich.

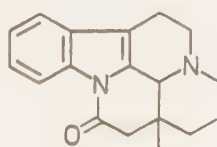
Im Gegensatz zu den beiden Kulturen von S. tomentosa und T. divaricata, bei denen beiden Formen gleichzeitig auftreten, findet man bei A. ciliata und T. iboga nur das (+)-Tubotaiwin und bei C. roseus nur zwei Strychnos-Alkaloide mit einer negativen optischen Drehung ((-)-Vinervin und (-)-Akuammicin). Somit scheint für beide Formen ein spezielles Enzym/Enzymsystem zu existieren, das bei A. ciliata/T. iboga oder C. roseus getrennt voneinander untersucht werden kann.

Stemmadenin, ein für Stemmadenia-Arten typisches Alkaloid, gilt als eines der wichtigsten Intermediate bei der Biosynthese der Aspidosperma- und Iboga-Typ-Alkaloide (WENKERT 1962, SCOTT 1969, CORDELL 1974). Doch auch bei schonendster Aufarbeitung konnte weder bei dem Stemmadenia Gewebe noch bei 8 weiteren untersuchten Suspensionskulturen Stemmadenin nachgewiesen werden. Ein Erklärungsmöglichkeit für das Fehlen dieser Substanz wäre, daß Stemmadenin sofort in die jeweiligen Alkaloide umgesetzt wird. Fraglich bleibt hier allerdings, wieso nicht einmal bei der Untersuchung unterschiedlich alten Gewebes (Gewebekinetik) geringste Spuren dieses Alkaloids nachweisbar waren. Eine andere mögliche Erklärung wäre, daß eine oxidierte Vorstufe des Stemmadenins das eigentliche Intermediat in der Biosynthesesequenz ist. An dieser Stelle bietet sich der Vergleich mit dem Geissoschizin an, von dem angenommen wurde, es sei das eigentliche Intermediat bei der Biosynthese der Heteroyohimbin-Alkaloide (SCOTT 1975). Erst später konnte die oxidierte Form (4,21-Dehydrogeissoschizin) als Intermediat nachgewiesen werden (PFITZNER 1984).

Bei der Zellsuspensionskultur von *R. stricta* sind die isolierten Verbindungen Vincadifformin, 1,2-Dehydroaspidospermidin, Eburnamonin und Eburnamin vom biosynthetischen Standpunkt her von besonderem Interesse. Man kann leicht einen strukturellen Zusammenhang zwischen 1,2-Dehydroaspidospermidin und Eburnamonin, aber auch zwischen Vincadifformin und Eburnamin erkennen.



1,2-Dehydroaspidospermidin



Eburnamonin

Durch chemische Synthesen unter oxidativen Bedingungen lassen sich die Alkaloide des Aspidosperma-Typs zu den Eburna-Alkaloiden überführen (HUGEL et al. 1972, DANIELI et al. 1981, CALABI et al. 1982). KUTNEY und Mitarbeiter (1971) konnten bei Fütterungsexperimenten an Vinca minor Pflanzen einen Einbau von Tabersonin und Stemmadenin in das Eburna-Skelett detektieren. Das Auffinden beider Strukturtypen ermöglicht es, diesen Schritt auf zellfreien Niveau zu untersuchen.

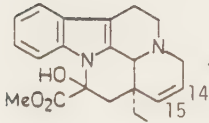
Für biosynthetische Untersuchungen ist es besonders wichtig eine Zellkultur zu finden, die einen Struktur-Typ vorrangig bildet. Das hat den Vorteil, daß eingesetzte Vorstufen hauptsächlich in die Produkte der zu untersuchenden Biosynthesesequenz eingebaut werden.

In diesem Zusammenhang scheint besonders die Zellkultur von V. africana ein geeignetes Untersuchungsobjekt zu sein. Hier konnten insgesamt 13 Indolalkaloide isoliert und identifiziert werden, von denen 9 zum Aspidosperma-Typ und 2 dem biogenetisch verwandten Eburna-Typ (HERBERT 1983) angehören. Faßt man die aus der Suspensionskultur von V. africana erhaltenen Ergebnisse zusammen, so kann man ausgehend vom Tabersonin den letzten Teil der Biosynthese der Aspidosperma-Typ-Alkaloide untersuchen (vergl. Abb. 58). So wäre es möglich, daß analog der Biosynthese von 16,17-Östratrien-3-ol (BREUER et al. 1969) an der Doppelbindung des Tabersonins (I) eine Epoxygruppe entsteht. Das Reaktionsprodukt Lochnericin (II) könnte durch eine Epoxyd-Hydrase (LU et al. 1978) zum Canganol (III) überführt werden. Die Reaktion einer gegebenenfalls reaktiven Ethylseitenkette mit der Hydroxylgruppe an C15 könnte zum Canganin (IV) führen, das nach Abspaltung der Carboxymethylgruppe und Einführen einer Methoxygruppe zum 1,2-Dehydrobeninin (V) reagieren könnte.

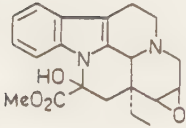
Ebenfalls ausgehend vom Tabersonin (14,15-Dehydrovincadifformin) ist eine Bildung des 14,15-Dehydrovincamins (IX) möglich. In einer, dem Übergang Tabersonin (I) $\longrightarrow$ Lochnericin (II) analogen Reaktion könnte aus Dehydrovincamin (IX) 14,15-Epoxyvincamin (X) entstehen.

Wie schon oben erwähnt, konnten bisher noch keine dimeren Alkaloide aus Zellsuspensionskulturen isoliert werden. Durch das Auffinden von Voafirin A (VI), Voafirin B (VII) und Vobtusin (VIII) wird es nun möglich, auch Dimerisierungsreaktionen auf zellfreien Niveau zu untersuchen. Die angegebenen Pfeile sollen auf Grund struktureller Übereinstimmungen mit den monomeren Alkaloiden auf eine mögliche Bildung der dimeren Strukturen hinweisen.

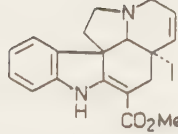
IX.



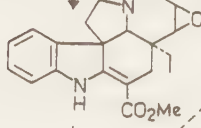
X.



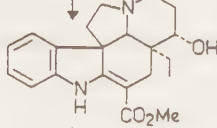
I.



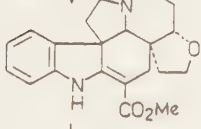
II.



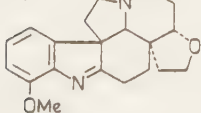
III.



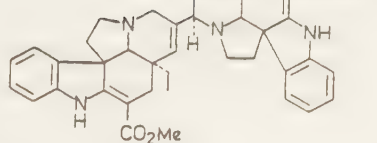
IV.



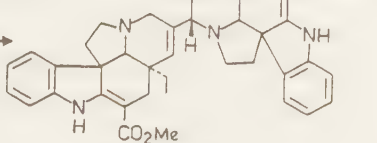
V.



VI.



VII.



VIII.

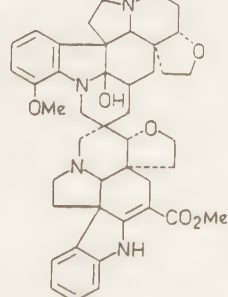


Abb. 58 : Auswahl von Alkaloiden, isoliert aus *Voacanga africana* Zellsuspensionskulturen, eingeordnet in ein mögliches Biosyntheschema.

- | | |
|-----------------------|----------------------------------|
| I: Tabersonin | VI. Voafirin A |
| II. Lochnericin | VII. Voafirin B |
| III. Canganol | VIII. Vobtusin |
| IV. Canganin | IX. 14,15-Dehydrovincamin-16-epi |
| V. 1,2-Dehydrobeninin | X. 14,15-Epoxyvincamin-16-epi |

Eine entscheidende Frage ist, will man Zellkulturen für die Produktion von Naturstoffen einsetzen, ob dies auch in einem wirtschaftlichen Rahmen ablaufen kann.

An dieser Stelle bietet sich zunächst ein Vergleich der Alkaloidgehalte von differenzierter Pflanze und Zellkultur an.

Alkaloid	diff. Pflanze	Zellkultur	
	%	%	mg/L Medium
Tabersonin	0,25 a)	0,87 b)	105,5 b)
Coronaridin	0,46 a)	0,008 b)	1,0 b)
Conoflorin	0,06 c)	0,014 b)	1,8 b)
Tabersonin	0,46 d)	1,13 e)	103,3 e)
Vobasin	0,019 d)	0,013 e)	1,2 e)
Vobtusin	0,016 f)	0,009 e)	0,9 e)

Tabelle 19 : Vergleich der Alkaloidgehalte von differenzierter Pflanze und Zellkultur.

- a) aus S.tomentosa
- b) aus der Zellkultur von S.tomentosa
- c) aus Conopharyngia longiflora
- d) aus V.africana
- e) aus der Zellkultur von V.africana
- f) aus Hedranthera barteri

Wie aus Tabelle 19 ersichtlich ist, können Apocynaceae Zellkulturen im Vergleich mit der differenziert wachsenden Pflanze durchaus auch höhere Konzentrationen an Indolalkaloiden enthalten. Eine weitere Steigerung ist durch Selektionsverfahren sicherlich möglich, wie das bei C. roseus gezeigt werden konnte (DEUS 1980).

Auf Grund der höheren Stoffwechselaktivität isoliert wachsender Zellen ist eine schnelle Produktion großer Gewebemengen möglich. Dies ist im Gegensatz zur Pflanze, die erst nach einigen Jahren abgeartet werden kann, für eine verbrauchsorientierte Produktion ein wesentlicher Aspekt.

Doch trotz dieser Vorteile muß, um eine wirtschaftliche Anwendung interessant zu machen : eine Kultur gefunden werden, die über Jahre hinaus stabil ist (DEUS-NEUMANN 1984), nach Übertragung der Kultur in Fermenter eine gewisse Mindestkonzentration erhalten bleiben und die Isolierung muß billiger als ein herkömmliches Verfahren sein.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Alkaloidmuster unterschiedlicher Apocynaceae-Gattungen aufzuklären und einen Vergleich mit der differenziert wachsenden Pflanze zu erstellen. Durch die Optimierung der Bedingungen für die Alkaloidproduktion sollte die verfügbare Alkaloidmenge erhöht und Spurenalkaloide einer Identifizierung zugänglich gemacht werden. Ausgehend von den identifizierten Verbindungen sollten Alkaloidsequenzen gefunden werden, die sich sinnvoll in einen möglichen Biosyntheseweg einordnen lassen.

Es wurden Verfahren entwickelt, die es möglich machten die in den Kulturen enthaltenen Alkaloide schnell zu isolieren und zu identifizieren. Durch die verwendeten chromatographischen Verfahren (Dünnschichtchromatographie, Säulenchromatographie und Hochdruckflüssigkeitschromatographie) konnten in kurzer Zeit reine Substanzen isoliert werden, deren Identifizierung durch die zur Verfügung stehenden spektroskopischen Methoden (UV, IR, MS) gelang. Als hilfreich erwies sich die von unserem Arbeitskreis zusammengestellte MS-Datensammlung von annähernd 1800 Indolalkaloiden. Das Fehlen eines NMR-Spektrometers führte auf Grund der langen Wartezeiten teilweise zur Zersetzung der Proben.

I.

Aus der Zellsuspensionskultur von Amsonia ciliata Walt. konnte das Alkaloid Tubotaiwin isoliert werden. Der Vergleich mit der differenzierte Pflanze zeigt, daß die Syntheseleistung der Zellkultur bei diesen Kulturbedingungen wesentlich geringer ist. Die extrahierte Alkaloidmenge von weniger als 0,1 mg pro Liter Medium zeigt, daß diese Kultur im 4X Medium für die Isolierung großer Alkaloidmengen als nicht geeignet erscheint. Tubotaiwin wurde bis jetzt noch nicht als typische Inhaltsstoff von Amsonia ciliata beschrieben.

II.

Die Zellkultur von Tabernanthe iboga Baill. enthält die beiden Alkaloide Conoflorin und Tubotaiwin. Die kultivierten Zellen bilden im Gegensatz zur Pflanze kein Alkaloid des Iboga-Typs. Nur Conoflorin

gehört zu den typischen Inhaltsstoffen. Tubotaiwin wurde hier zum ersten Mal als Inhaltsstoff von I. iboga beschrieben. Die aus der Kultur isolierten Alkaloidmengen waren mit weniger als 50 µg pro Liter Medium gerade noch ausreichend für eine Identifizierung, eine Isolierung großer Alkaloidmengen erscheint wie bei A. ciliata unter den gewählten Bedingungen nicht möglich.

III.

Die Suspensionskultur von Tabernaemontana divaricata R.Br. ex Roem. et Schult. enthält 7 Hauptalkaloide : Apparicin, Catharanthin, Conoflorin, Coronaridin, 19-OH-Coronaridin, Tubotaiwin und Vinervin. Im Gegensatz zu der differenzierten Pflanze, die nur Alkaloide vom Aspidosperma- und Iboga-Typ bildet, ist die Zellkultur in der Lage, Indolalkaloide von 4 verschiedenen Struktur-Typen zu produzieren (Apparicin-, Aspidospermidin-, Iboga- und Strychnos-Typ). Zusätzlich waren noch zwei Verbindungen nachweisbar, die auf Grund massenspektroskopischer Daten in die Gruppe der Bisindolalkaloide einzuordnen sind. In diesem Fall fehlte allerdings die zur Identifizierung notwendige Substanzmenge.

IV.

Aus der Suspensionskultur von Ochrosia elliptica Labill. konnten 10 Hauptalkaloide isoliert und 7 davon eindeutig identifiziert werden: Apparicin, 19,20-Epoxyapparicin, Cathenamin, Norfluorocurarin, Pericidin, Pleiocarpamin und Tetrahydroalstonin. Die Alkaloide gehören 4 verschiedenen Strukturtypen an : Apparicin-, Corynanthe-, Pleiocarpamin- und Strychnos-Typ.

Die Struktur von 19,20-Epoxyapparicin, einem in der Literatur bisher nicht beschriebenen Indolalkaloid, konnte mit Hilfe von Massen- und NMR-spektroskopischen Daten aufgeklärt werden. Besonders hilfreich erwies sich die zweidimensionale NMR-Technik, durch die eine eindeutige Zuordnung der Protonen des aliphatischen Teil möglich war. Durch den Vergleich mit einem Alkaloid, das auch an der Ethylseiten- eine Epoxyfunktion enthält, konnten die aus dem NMR-Spektrum erhaltenen Informationen überprüft und bestätigt werden.

V.

Die Zellkultur von Rhazya stricta Decne. enthält 11 Hauptalkaloide. 8 dieser Alkaloide gehören auch zu den bei der Pflanze beschriebenen Inhaltsstoffen : Akuammidin, 1,2-Dehydroaspidospermidin, Eburnamin, Eburnamonin, Norfluorocurarin, Tetrahydrosecodin, Vallesiachotamin und Vincadifformin. Die ebenfalls noch isolierten und identifizierten Alkaloide Tabersonin, Akuammicin und Strictosidinlactam werden hier zum ersten Mal als Inhaltsstoffe von R. stricta beschrieben. Das gemeinsame Vorkommen der Aspidosperma-Typ-Alkaloide (-)-Tabersonin sowie (+)-Vincadifformin und (+)-1,2-Dehydroaspidospermidin ist nicht ungewöhnlich. Ein weiteres Beispiel hierfür ist die Pflanze Amsonia-tabernaemontana (PANAS et al. 1972 und ZSADON et al. 1970).

Als Wachstumsmedium hat sich beim Vergleich von 4 unterschiedlichen Medien das AP-Try Medium bei R. stricta als besonders geeignet erwiesen.

VI.

Suspensionskulturen von Stemmadenia tomentosa var. palmeri (Rose). enthalten insgesamt 10 Alkaloide, die 5 verschiedenen Alkaloid-Typen angehören. Coronaridin und Tabersonin gehören zu den typischen Alkaloiden dieser Stemmadenia-Art (COLLERA et al. 1962). Tubotaiwin wurde bei einer anderen Stemmadenia-Art beschrieben (S. glabra, CICCIO et al. 1979). Alle anderen aus der Zellkultur isolierten Verbindungen (Condylocarpin, Conoflorin, Geissoschizin, Minovincinin, Norfluorocurarin, Pleiocarpamin und Vinervin) wurden bei den bis jetzt untersuchten Pflanzenteilen von S. tomentosa nicht gefunden und werden hier zum ersten Mal als Inhaltsstoff beschrieben. Eine nachträgliche Untersuchung der Blätter von Stemmadenia tomentosa bestätigte das Fehlen dieser Alkaloide. Stemmadenin, das für diese Pflanze typische Alkaloid und mögliches Intermediat in der Biosynthese der Aspidosperma-, Iboga- und Strychnos-Alkaloide konnte auch bei sehr schonenden Aufarbeitungsmethoden und unterschiedlichen Wachstumsbedingungen nicht nachgewiesen werden.

Durch die Optimierung der Bedingungen für die Alkaloidproduktion war es möglich, die Alkaloidmengen erheblich zu steigern. Durch das Überführen des Zellmaterials in das LS Medium konnte im Vergleich zu dem anfänglich verwendeten 4X Medium beim Tabersonin eine Steigerung um

den Faktor 20 erreicht werden.

VII.

Bei einer ersten Aufarbeitung der Zellkultur von Voacanga africana Stapf, wurden die 3 Aspidosperma-Typ-Alkaloide Tabersonin, Lochnericin und Minovincinin isoliert.

Bei der Suche nach einem geeigneten Alkaloidproduktionsmedium stellte sich das AP Medium als besonders geeignet heraus. Durch die erhebliche Steigerung der Alkaloidkonzentrationen im Vergleich zu dem zunächst verwendeten 4X Medium (Steigerung bis zum Faktor 1000) konnten auch die in geringerer Menge enthaltenen Alkaloide einer Identifizierung zugänglich gemacht werden. Dabei wurden 10 weitere Indolalkaloide isoliert und identifiziert: 1,2-Dehydrobeninin, Canganin, Canganol, Conoflorin, 14,15-Dehydrovincamin, Epoxyvincamin, Voafrin A, Voafrin B, Vobasin und Vobtusin.

5 dieser Alkaloide sind neue Verbindungen und werden hier zum ersten Mal beschrieben: Canganin, Canganol, Voafrin A, Voafrin B und Epoxyvincamin. Die Strukturaufklärung erfolgte mit Hilfe der UV-, MS- und NMR-Spektroskopie, wobei auch hier die zweidimensionale NMR-Methode eine wesentliche Vereinfachung bei schwierigen Zuordnungsproblemen brachte.

Beim Canganin handelt es sich um ein in der Literatur noch nicht beschriebenes Desmethoxyvandrikin, das ebenfalls neue Canganol ist ein 15- α -Hydroxyvincadifformin.

Voafrin A und Voafrin B gehören, wie das ebenfalls isolierte Vobtusin, in die Gruppe der Bisindolalkaloide. Dimere Indolalkaloide konnten bisher noch nie aus pflanzlichen Zellkulturen isoliert und identifiziert werden. Die Zellsuspensionskultur von Voacanga africana ist bis jetzt das einzige Beispiel dafür, daß auch aus kultivierten Zellen dimere Indolalkaloide in größeren Mengen isoliert werden können.

VIII.

Ausgehend von den Alkaloidmustern lassen sich die aufgefundenen Alkaloide in mögliche Biosynthesesequenzen einordnen.

So lassen sich beispielsweise bei der Zellkultur von S. tomentosa ausgehend vom Dehydrogeissoschizin - in der Zellkultur war das reduzierte Produkt nachweisbar - sowohl das isolierte Pleiocarpamin

wie auch die Strychnos-Typ-Alkaloide (+)-Condyllocarpin, (+)-Tubotaiwin sowie (-)-Vinervin und (-)-Norfluorocurarin gut in einen 1974 von CORDELL formulierten Biosyntheseweg einordnen.

Die Suspensionskultur von R. stricta eignet sich insbesondere für eine Untersuchung der Biosynthese der Eburna-Alkaloide ausgehend von den Aspidosperma-Typ-Alkaloiden.

Die Aspidosperma-Typ-Alkaloide aus der Kultur von V. africana lassen sich ausgehend vom Tabersonin gut in ein mögliches Biosyntheschema einordnen. Durch das Auffinden von Voafirin A, Voafirin B und Vobtusin wird es möglich, auch Dimerisierungsreaktionen gut auf zellfreien Niveau zu untersuchen.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- ABDURAKHIMOVA N.; P.K. YULDASHOV, S.Y. YUNUSOV : Pseudokopsinine -
a New Alkaloid from Aerial Parts of Vinca erecta
Dokl.Akad.Nauk.UZ.SSR 21, 29-31 (1964)
- ACHENBACH H.; B. RAFFELSBERGER : Alkaloide aus tabernaemontana-
Arten XI
Z.Naturforsch. 35b, 219-225 (1980)
- AGWADA V.; M. B. PATEL, M. HESSE, H. SCHMID : Die Alkaloide aus
Hedranthera barteri (Hook.f.) Pichon
Helv.Chim.Acta 53, 1567 (1970)
- AGWADA V.C.; Y. MORITA, U.RENNER, M. HESSE, H. SCHMID : Die Alkaloide
von Gabunia eglandulosa STAPP.
Phytochemistry 14, 1649-1652 (1975)
- AKHTER L.; R.T. BROWN, D. MOORCROFT : 10-Hydroxy- and 10-Methoxy-
apparicine : Two New Alkaloids from Ochrosia oppositifolia
Tetrahedron Lett. 4137 (1978)
- ALBERT O.; M. DUPONT, M. QUIRIN : Pharmacodynamic Properties of an
Indole Alkaloid : Dregamin
Ann.Pharm.Fr. 28, 697-706 (1970)
- ALFERMANN A.W.; W. BERGMANN, C. FIGUR, U. HELMBOLD, D. SCHWANTAG,
I. SCHÜLLER, E. REINHARD : Biotransformation of B-Methyl-
digitoxin by Plant Cell Cultures of Digitalis lanata
In : Proceedings of the 204th Conference of the Society
for Experimental Biology 1983
- ANTONACCIO L.D.; N.A. PEREIRA, B. GILBERT, H. VORBRUEGGEN, H. BUDZIKIEWICZ,
J.M. WILSON, L.J. DURHAM, C. DJERASSI : Alkaloid Studies XXXIII.
Mass Spektrometry in Structural and Stereochemical Problems
J.Am.Chem.Soc. 84, 2161 (1962)
- ARENS H.; H.O. BORBE, B. ULBRICH, J. STÖCKIGT : Detektion of Pericine, a New
CNS-aktive Indole Alkaloid from Picralima nitida Cell Suspension
Cultures by Opiate Receptor Binding Studies
Planta medica 46, 210-214 (1982)
- AYABE S.; T. YOSHIKAWA, T. FURUYA : Biosynthesis of Retrochalcone
and Related Flavonoids in Tissue Culture of Glycyrrhiza
echninata
In : 5th International Congress of Plant Tissue and Cell
Culture. A. Fujiwara 379-380 (1982)
- BALDWIN M.A.; F.W. MC LAFFERTY
Org. Mass. Spektrom. 7, 1353 (1973)
- BARLETT M.F.; R. SKLAR, A.F. SMITH, W.I. TAYLOR : The Alkaloids of Hunteria
eburnea Pichon III.
J.Org.Chem. 28, 2197 (1963)

- BATTERSBY A.R.;A.R.BURNETT,P.G.PARSONS : Alkaloid Biosynthesis Part XV. Partial Synthesis and Isolation of Vincoside and Isovincoside. Biosynthesis of the three Major Classes of Indole Alkaloids from Vincoside
J.Chem.Soc. 1193-1200 (1969)
- BATTERSBY A.R.;A.K.BHATNAGAR : Evidence from Synthesis and concerning the Rearrangement Process an Indole Alkaloid Biosynthesis
Chem.Comm. 193 (1970)
- BAUMANN T.W.; M. FRISCHKNECHT : Biosynthesis and Biodegradation of Purine Alkaloids in Tissue Cultures
In : 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. A. Fujiwara (Herausg.) Tokyo, 1982
- BELLEFON M.; M.M. DEBRAY, L LE MEN-OLIVIER, J. LE MEN : Alcaloides du *Pandaca mocquersii* var. *Pendula*
Phytochemistry 14, 1649-1652 (1975)
- BENDALL M.R.; D.M. DODRELL, D.T. PEGG, W.E. HULL : DEPT - Bruker - Informationsbroschüre
Bruker Analytische Meßtechnik, Karlsruhe 1982
- BENN R.; H. GÜNTHER : Moderne Pulsfolgen in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie
Angew. Chem. 95, 381-411 (1983)
- BERLIN J.; K.H. KNOBLOCH, G. HÖFLE, L. WITTE : Biochemical Characterization of Two Tobacco Cell Lines with Different Levels of Cinnamoyl Putrescines
J.Nat.Prod. 45, 83-87 (1982)
- BIEMANN K. : Mass Spectrometry, Organic Chemical Application
McGraw- Hill , New York (1962)
- BIEMANN K.; A. L. BURLINGAME, D. STAUFFACHER : Application of Mass Spectrometry to Structure Problems : Condylocarpin
Tetrahedron Lett. 527-532 (1962 a)
- BIEMANN K.; G. SPITELLER : Application of Mass Spectrometry to Structure Problems. VIII Quebrachamin
J.Am.Chem.Soc. 84, 4578 (1962)
- BISSON W.; R. BEIDERBECK, I. REICHLING : Die Produktion ätherischer Öle durch Zellsuspensionen der Kamille in einem Zweiphasensystem
Planta Med. 47, 164-168 (1983)
- BOJTHE-HORVAT K.; A. KOCSIS, J. MATHE, J. TAMAS, O. CLAUDER : Alkaloids of *Amsonia angustifolia*
Acta Pharm. Hung. 44, 66-69 (1974)
- BRADFORD M. : A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye-Binding
Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976)

- BREUER H.; R. KNUPPEN : Enzymes of Estrogen Metabolism
In : Methods In Enzymology Vol.15, 691-736 (1969)
- BROWN R.T.; G.F.SMITH, K.S.J.STAPLEFORD, D.A.TAYLOR : The Occurrence
of 16,17,15,20-Tetrahydrosecodin in Rhazya orientalis
Chem.Comm. 191 (1970)
- BRUNETON J.; A. BOUQUET, A. CAVE : Alcaloïdes des Ecores de Racines
de Crioceras diplendiiflorus
Phytochemistry 12, 1475 (1973)
- BUDZIKIEWICZ H.; J.M. WILSON, C. DJERASSI, J. LEVY, J. LE MEN, M.M.
JANOT : Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical
Problems XIX.
Tetrahedron 19, 1265 (1963)
- BYCROFT B.W.; D. SCHUMANN, M.B. PATEL, H. SCHMID : Weitere Alkaloïde
aus den Blättern von Pleiocarpa tubicina : Umwandlung von
(-)-Quebrachamin in (+)-1,2-Dehydroaspidospermidin
Helv.Chim.Acta 47, 1147 (1964)
- CALABI L.; B. DANIELI, G. LESMA, G. PALMISANO : Dye-Sensitized Photo-
Oxygenation of the Aspidosperma Alkaloids Vincadifformin
and Tabersonin
J. Chem. Soc. Perkin Trans I , 1371-1379 (1982),
- CAREW D. : Tissue Culture Studies of Catharanthus roseus
In : The Catharanthus Alkaloids. Taylor, W.I., Farnsworth N.R.
(Herausg.) New York Marcel Dekker 1975 (193-208)
- CHATTERJEE A.; A.BANERJI, P.MAJUMDER, R.MAJUMDER : Alkaloids of Rhazya
stricta Dec.
Bull.Chem.Soc.Japan 49, 2000-2004 (1976)
- CHOPRA R.N.; S.L.NAYER, I.C.CHOPRA : Glossary of Indian Medicinal
Plants
CSIR, New Delhi (1956) Seite 212
- CICCO J.F.; C.H.HERRERA, V.H.CASTRO, M.RALITSCH
Rev.Latinoam.Quim. 67 (1979)
- COLLERA O.; F. WALLS, A. SANDOVAL, F. GARCIA, J HERRAN, M.C. PEREZAMADOR:
Alkaloids from Stemmadenia Species
Bol. Inst. Quim. 14, 3-18 (1962)
- COLE R.J.; I.W. KIRKSEY, H.G. CUTLER, D.M. WILSON, S.G. MORGAN-JONES :
Two Toxic Indole Alkaloids from Penicillium islandicum
Can.J.Mikrobiol. 22, 741-744 (1976)
- CORDELL G.A.; G.F.SMITH, G.N.SMITH : The Isolation of Monomeric Secodin-
Typ Alkaloids from Rhazya Species
Chem.Comm. 189 (1970)
- CORDELL G.A. : The Biosynthesis of Indole Alkaloids
Lloydia 37, 219 (1974)
- CORDELL G.A. : Introduction to Alkaloids
J.Wiley and Sons, New York-Chichester-Brisbane-Toronto 1981

- CORDELL G.A.; J.E. SAXTON : Bisindole Alkaloids
In : The Alkaloids Vol XX R.H.F. Manske (Herausg.)
Academic Press, New York 1981 a
- CZYGAN F.C. : Möglichkeiten zur Produktion von Arzneistoffen durch
pflanzliche Gewebekulturen
Planta Med. Suppl. 169-185 (1975)
- DALTON D.R. : The Alkaloids. The Fundamental Chemistry
Marcel Dekker, New York, Basel 1979
- DANIELI B.; G.LESMA, G. PALMISANO, B. GABETTA : Ozonisation in Alkaloid Chemistry : a Mild and Selektiv Conversation of Vincadifformin in Vincamin
J. Chem. Soc. Chem. Comm. 908-909 (1981)
- DEUS B. : Stoffwechselleistungen varianter Stämme pflanzlicher Zellkulturen
Dissertation, Bochum 1980
- DEUS B.; M.H. ZENK : Exploitation of Plant Cells for the Produktion of Natural Compounds
Biotechnology and Bioengineering Vol XXIV 1965-1974 (1982)
- DEUS-NEUMANN B.; M.H. ZENK : Instability of Indole Alkaloid Produktion in *Catharanthus roseus* Cell Suspension Cultures.
Planta medica 427-431 (1984)
- DICKEL D. F.; C. L. HOLDEN, R.C. MAXFIELD, L.E. PASZEK, W.I. TAYLOR : The Alkaloides of *Tabernanthe iboga*. Part III. Isolation Studies
J. Am. Chm. Soc. 80, 123-125 (1958)
- DJERASSI C.; H.BUDZIKIEWICZ, J.M.WILSON, J.GOSSET, J.LEMEN, M.M.JANOT : Mass Spektrometry In Structural and Stereochemical Problems
Tetrahedron Lett. 235-239 (1962)
- DJERASSI C.; H.J.MONTEIRO, A.WALSER, L.J.DURHAM : Alkaloid Studies LVI. The Constitution of *Vallesiachotamine*
J.Am.Chem.Soc. 88, 1792-1798 (1966)
- DÖLLER G. : Influence of the Medium on the Production of Serpentine by Suspension Cultures of *Catharanthus roseus*
In : Production of Natural Compounds by Cell Culture Methods
A.W.Alfermann, E.Reinhard (Herausg.) 109-116
Ges. f. Strahlen- u. Umweltforsch. München 1978
- DOMINGUEZ X.A.; D.BUTUVILLE, P.PEREYRA : Preliminary Study of *Stemmadenia galleotiana*
Rev.Latioam.Quim.7, 98 (1976)
- DUGAN J.J.; M. HESSE, U.RENNER, H. SCHMID : Conoflorin
Helv. Chim.Acta 50, 60 (1967)
- FARNSWORTH N.R.; R.W. MORRIS : Higer Plants-the Sleeping Gigant of Drug Development
Am.J.Pharmacy 148, 46-52 (1976)

- FISH F.; F. NEWCOMBE : Comparative Anatomy of the Stem Barks of Voacanga africana and Voacanga schweinfurthii Planta medica 14, 131-145 (1966)
- FUJITA Y.; Y. HARA, C.SUGA, T. MORIMOTO : Production of Shikonin Derivatives by Cell Suspension Cultures of Lithospermum erythrorhizon . II. A New Medium for the Production of Shikonin Derivatives Plant Cell Rep. 1, 61-63 (1981)
- FURUYA T.; T. ISHII : The Manufacturing of Panax Plant Tissue Culture Containing Crude Saponins and Crude Sapogenins which are identical with those of Natural Panax Roots Japan. Patent Appl. No. 48-31917 (1973)
- FURUYA T.: Biotransformation by Plant Cell Cultures In : Frontiers of Plant Cell Culture. T.A. Torpe (Herausg.) 191-200 (1978)
- GAMBORG O.L.; R.A. MÜLLER, K. OJIMA : Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soyabean Root Cells Exp. Cell Res. 50, 151-158 (1968)
- GOODWIN, S.; A.F. SMITH, E.C. HORNING : Alkaloids of Ochrosia elliptica Labill. J.Am.Chem.Soc. 81, 1903 (1959)
- GORMAN M.; N. NEUSS, G.H. SVOBODA, A.J. BARNES, N.J. CONE : A Note on the Alkaloids of Vinca rosea Linn (Catharanthus roseus G. DON.) II. Catharanthine, Lochnericine, Vindolinine and Vindoline J.Am.Pharm.Assoc., Sci. Ed. 48, 256-257 (1959)
- GORMAN M.; N. NEUSS, N.J. CONE, J.A. DEYRUP : Alkaloids from Apocynaceae III. Alkaloids of Tabernaemontana and Ervatamia. The Structure of Coronaridine, A New Alkaloid Related to Ibogamine J.Am.Chem.Soc. 82, 1142 (1960)
- GORMANN A.A.; V. AGWADA, M. HESSE, U. RENNER, H. SCHMID : Zur Chemie des Beninins und des Vobtusins Helv. Chim. Acta 49, 2073 (1966)
- GOUTAREL R.; I. POISSON, G. CROQUELOIS, Y. ROLLAND, C. MIET : Constituents of Seeds of Tabernanthe iboga I. Alkaloids Ann. Pharm. Fr. 32, 521 (1974)
- GRESHOFF M. : Mitteilungen aus dem chemisch-pharmakologischen Laboratorium des botanischen Gartens zu Buitenzorg (Java) Ber. Dtsch. Chem. Ges. 23, 3537 (1890)
- GUDZINOWICZ B.J.; M. J. GUDZINOWICZ, H. F. MARTIN : Fundamentals of Integrated GC-MS. Marcel Dekker, New York 1976

- HAHLBROCK K. : Regulatory Aspekts of Phenylpropanoid Biosynthesis in Cell Cultures. In: Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application. Barz W., M.H. Zenk (Herausg.) Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1977 , 95-111
- HEMSCHIEDT T. : Bildung und Umsetzung von Imminium-Cathenamin, katalysiert durch spezifische Enzyme aus *Catharanthus roseus* Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität, München 1984
- HERBERT R.B. : Struktural and Biosynthetic Relationships
In : Monoterpenoid Indole Alkaloids E. Saxton (Herausg.) Wiley and Sons, Inc. 1983
- HESSE M.; W. v. PHILLIPS BORN, D. SCHUMANN, G. SPITELLER, M. SPITELLER-FRIEDMANN, W. I. TAYLOR, H. SCHMID, P. KARRER : Die Strukturen von C-Fluorocurin, C-Mavacurin und Pleiocarpamin
Helv. Chim. Acta 47, 878 (1964)
- HESSE M. : Indolalkaloide, In : Fortschritte der Massenspektroskopie H. Budzikiewicz (Herausg.) Vol 1
Verlag Chemie, Weinheim 1979
- HOFFMANN W.; K.-H. KUBECZKA, F. C. CZYGAN : Ein verbessertes Verfahren zur Isolierung und quantitativen Bestimmung von Vincalcalcin aus intakten Pflanzen und Gewebekulturen von *Catharanthus roseus* G. Don.
Z. Naturforsch. 38c, 201-206 (1983)
- HOOKE J.D.: Flora of British India Vol. III,
Reeve & Co, London (1875), Seite 640
- HOSTETTMANN K.; M. HOSTETTMANN-KALDAS, O. STICHER : Preparative Scale Separation of Xanthenes and Iridoid Glycosides by Droplet Counter-Current Chromatography
Helv. Chim. Acta 62 , 2079 (1979)
- HOSTETTMANN K. : DCCC and its Application to the Preparative Scale Separation of Natural Products
Planta Medica 39, 1-18 (1980)
- HOSTETTMANN K. : Droplet Counter-Current Chromatography, an Ideal Method for the Isolation of Natural Products
In : Natural Products as Medicinal Agents. J.L. Beal, E. Reinhard (Herausg.) Hippokrates Verlag Stuttgart 1981
- HUGEL G.; J. LEVY, L. LE MEN
Ger. Offen 2, 201,795 (1972) (CA 77, 152430 t)
- HUGEL G.; B. GOURDIER, J. LEVY, J. LE MEN : Methylene- Indolines, Indolenins et Indoleninins VIII
Tetrahedron Lett. , 1597-1600 (1974)
- JANOT M. M. ; H. POURRAT, J. LE MEN : Sur la Tabersonine, Alkaloide
Extrait des Graines de *Amsonia tabernaemontana* Walt.
Bull. Soc. Chim. Fr. , 707 (1954)

- JHANG J.J.; E.J. STABA, I.K. KIM : American and Korean Gingseng Tissue Cultures : Growth, Chemical Analysis, and Plantlet Formation In Vitro 9, 253-259 (1974)
- JOULE J.A.; H. MONTEIRO, L.I. DURHAM, B. GILBERT, C. DJERASSI : Alkaloid Studies. Part XLVIII. The Structure of Apparicine a Novel Aspidosperma Alkaloid J.Chem.Soc. 4773 (1965a)
- JOULE J.A.; M. OHASHI, B. GILBERT, C. DJERASSI : Alkaloid Studies LIII. The Structure of Nine New Alkaloids from Aspidosperma dasycarpon A. DC. Tetrahedron 21, 1717 (1965)
- KAUL B.; S.J. STOKS, E.J. STABA : Dioscorea Tissue Cultures. III. Influence of Various Faktors on Diosgenin Production by Dioscorea deltoidea Callus and Suspension Culture Lloydia 32, 347-359 (1969)
- KHANNA P.; T.N. NAG : Isolation, Identification and Screening of Phyllembin from Emblia officinalis Gaertn. Tissue Culture Indian J.Pharmacy 35, 23-24 (1973)
- KNOBLOCH K.H.; J. BERLIN : Influence of Medium Composition on the Formation of secondary Compounds in Cell Suspension Cultures of Catharanthus roseus (L.) G. DON. Z. Naturforsch. 35c, 551-556 (1980)
- KOHL W.; B. WITTE, G. HÖFLE : Alkaloide aus Catharanthus roseus Zellkulturen II. Z.Naturforsch. 36b, 1153-62 (1981)
- KOHL W.; B. WITTE, G. HÖFLE : Quantitative und qualitative HPLC-Analytic von Indolalkaloiden aus Catharanthus roseus- Zellkulturen. Planta medica 47, 177-182 (1983)
- KOMPIS I.; M. HESSE, H. SCHMID : An Approach to the Biogenetic Classification of Indole Alkaloids Lloydia 34, 269-291 (1971)
- KONDA Y.; Y. SUZUKI, S. OMURA, M. ONDA : Alkaloids from Thermoactinomyces Species Chem.Pharm.Bull 24, 92-96 (1976)
- KOVACIK V.; I. KOMPIS : Mass Spectrometry of Eburnamin-Typ Alkaloids Coll. Czech. Cem. Comm. 34, 2809 (1968)
- KUMP W.G.; H. SCHMID : Über die Alkaloide von Pleiocarpa mutica Benth. Helv.Chim.Acta 44, 1503 (1961)
- KUMP W.G.; M.B. PATEL, J.M. ROWSON, H. SCHMID : Indolalkaloide aus den Blättern von Pleiocarpa pycnantha (K. Schum.) STAPF, var. tubicina (STAPF) PICHON Helv.Chim.Acta 47, 1497-1503 (1964)

- KUNESCH N.; I. POISSON, B.C. DAS : Alcaloides des Voacanga; Structure des deux Nouveaux Alcaloides Dimeres du Voacanga africana Stapf.
Tetrahedron Lett. 1745 (1968)
- KUNESCH N.; B.C. DAS, I. POISSON : Alkaloides des Voacanga. Structure des Bases Bis-Indoliques des Feuilles du Voacanga africana Stapf.
Bull. Soc. Chim. Fr. 4370 (1970)
- KUNESCH N.; I. POISSON, J. GUILHEM : Sur la Configuration de la Voaphylline et de ses Derives
Bull. Soc. Chim. Fr. 1919 (1971)
- KUNESCH N.; J. ARDISON, J. POISSON, T.D. HALLS, E WENKERT : Natural Products of Degradation of the Aspidosperma Sceletum
Tetrahedron Lett. 23, 1981 (1981)
- KURZ W.G.W.; K.B. CHATSON, F.CONSTABEL, J.P. KUTNEY, L.S.L. CHOI, P. KOLODZIEJCZYK, S.K. SLEIGH, K.L. STUART, B.R. WORTH : Alkaloid Production in Catharanthus roseus Cell Cultures IV. Charakterisation of the 953 Cell Line
Helv. Chim.Acta 63, 1891 (1980)
- KUTNEY J.P.; V.R. NELSON, D.C. WIGFIELD : Studies on Indole Alkaloid Biosynthesis III
J.Am.Chem.Soc. 91, 4278 (1969)
- KUTNEY J.P.; E.PIERS : The Chemistry of Clevamine : A Novel Trans-annular Cyclisation Relating to Biosynthesis of Aspidosperma Alkaloids
J.Am.Chem.Soc. 86, 953-955 (1964)
- KUTNEY J.P.; J.F. BECK, V.R. NELSON, R.S. SOOD : Studies on Indole Alkaloid Biosynthesis VI. The Eburnamin - Vincamin Alkaloids
J. Am. Chem. Soc. 93, 255-257 (1971)
- KUTNEY J.P.; G.B. FULLER
Heterocycles 3, 197 (1975)
- KUTNEY J.P.; L.S.L. CHOI, P. KOLODZIEJCZYK, S.K. SLEIGH, K.L. STUART, B.R. WORTH : Alkaloid Production in Catharanthus roseus Cell III. Catharanthin and other Alkaloids from the 200 GW Cell Line
Heterocycles 14, 765-768 (1980)
- LANDRIN A. : L' Iboga - Etude Botanique, Pharmacologique et Clinique
Bull. Sci. Pharmacol. 11, 319-322 (1905)
- LINSMAIER E.M.; F. SKOOG : Organic Growth Factors Requirements of Tobacco Tissue Cultures.
Physiol.Plant. 18, 110-125 (1965)
- LOUNASMAA M.; S.K. KAN : A 400 MHz ¹H-NMR Study of five Aspidosperma-Type Alkaloids
Acta Chem.Scand.,Ser B. 34, 379 (1980)

- LU A.Y.H.; W. LEVIN : Purification and Assay of Liver Mikrosomal Epoxide Hydrase
In : Methods in Enzymology Vol. 52, 193-200 (1978)
- LUCKNER M.; B. DIETRICH : Die Regulation des Sekundärstoffwechsels
In : Biogene Arzneistoffe Czygan F. C. (Herausg.)
Vieweg Verlag, Braunschweig, Wiesbaden (1983)
- MAMATAS-KALAMARAS S.; T. SEVENET, C. THAL, P. POTIER : Alcaoides d' Alstonia quaternata
Phytochemistry 14, 1849-1854 (1975)
- MATOS F.J.; R. BRAZ, O. GOTTLIEB, F. MACHADO, M.I. MADRUGA : 20'Epi-heyneanin, an Iboga Alkaloid from Peschiera affinis
Phytochemistry 15, 551 (1976)
- MATSUMOTO M.; T.N. KANNO, T. IKEDA, Y. OBI, T. KISAH, M. NOGUCHI : Selection of Cultures Tobacco Cell Strains Producing High Levels of Ubichinone-10 by a Cell Cloning Technique
Agrc. Biol. Chem. 45, 1627-1633 (1981)
- MISAWA M.; K. SAKATO, K. SHIMADA, Y. OMOTANI : Production of Pysio-logically Active Substances by Plant Cell Suspension Cultures
In : Tissue Culture and Plant Science. Steet H.E.(Herausg.)
Academic Press, London 405-432 (1974)
- MOZA B.K.; J. TOJANEK, L. DUBRAKOVA, P. SEFORIC : Vincadifformin und Minovin, zwei weitere racemische Alkaloide aus Vinca minor L.
Experientia 19, 311 (1963)
- MUCCINO R.R.; L. SERICO : Acid Catalysed Tritium Exchange of Activated Aromatic Protons
J.Labelled Compounds Radiopharm. 15, 529-532 (1978)
- MUKHOPADHYAY S.; G.A.HANDY, S.FUNAYAMA, G.A.CORDELL : Anticaner Indole Alkaloids of Rhazya stricta
J.Nat.Prod. 44, 696 (1981)
- MUTSCHLER E. : Arzneimittelwirkungen
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 1981
- NABIH T.; L. YOUEL, J.P. ROSAZZA : Microbial Transformations of Natural Antitumour Agents. Part V. The Structure of a Novel Dimer Produced by Strptomyces griseus
J.Chem.Perkin Trans 1, 757-762 (1978)
- NARANJO J.; M. HESSE, H. SCHMID : Indolalkloide aus den Blättern von Hedranthera barteri (Hook f.) Pichon
Helv.Chim.Acta 55, 1849 (1972)
- NEUSS N. : The Spectrum of Biological Activities of Indole Alkaloids
In : Indole and Biogenetically Related Alkaloids
J.D.Phillipson, M.H.Zenk (Herausg.)
Academic Press, New York 1980

- OHASHI M.; H. BUDZIKIEWICZ, J. M. WILSON, C. DJERASSI, J. LEVY, J. GOSSET, J. LEMEN
M. M. JANOT : Mass Spectrometry in Structural and Stereo -
chemical Problems XXXVI
Tetrahedron 19, 2241 (1963)
- OVERTON K. H. : Biosynthesis of Mevaloid-Derived Compounds in Cell
Cultures
In : Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Appli-
cation Barz W., Zenk M. H. (Herausg.), Springer Verlag ,
Berlin, Heidelberg, New York 1977
- PANAS J.; A. MORFAUX, L. OLIVIER, J. LE MEN
Ann. Pharm. Fr. 30, 273 (1972)
- PAWELKA K.-H.; J. STÖCKIGT : Indole Alkaloids from Cell Suspension
Cultures of *Tabernaemontana divaricata* and *Tabernanthe iboga*
Plant Cell Reports 2, 105-107 (1983)
- PETIARD V.; D. COURTOIS, F. GUERITTE, N. LANGLOIS, B. MOMPON : New
Alkaloids in Plant Tissue Cultures
In : 5th International Congress of Plant Tissue and Cell
Culture. A. Fujiwara 309-310 (1982)
- PFITZNER A. : Die Biosynthese der Rauwolfia-Alkaloide Sarpagin und
Ajmalin
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München 1984
- PHILLPSBORN W.; K. BERNAUER, H. SCHMID, P. KARRER : Die Struktur des
Fluorocurarin
Helv. Chim. Acta 42, 461 (1959)
- PICHON M. : Classification des Apocynacees I. Carissees et Ambelaniees
Mem. Mus. Hist. Nat. Nou. Ser. 24, 111-181 (1948)
- PICHON M. : Classification des Apocynacees X. Rauwolfiees, Alstoniees,
Allamandees et Tabernaemontanoidees.
Mem. Mus. Nat. Hist. Nou. Ser. 27, 153-251 (1948)
- PICHON M. : Classification des Apocynacees V. Cerberioidees
Not. Syst. 13, 212-229 (1948)
- PICHON M. : Classification des Apocynacees VI. Genre Tabernaemontana
Not. Syst. 13, 230-254 (1948)
- PLAT M.; J. LE MEN, M. JANOT, J. M. WILSON, A. BUDZIKIEWICZ, L. DURHAM,
Y. NAKAGAWA, C. DJERASSI : Tabersonine : Alkaloids of *Amsonia*
tabernaemontana
Tetrahedron Lett. 271-276 (1962)
- PLAT M.; J. LE MEN, M. M. JANOT, H. BUDZIKIEWICZ, J. M. WILSON, L. J.
DURHAM, C. DJERASSI : Structure de quatre Alcaloides
de la Petite Perveche
Bull. Soc. Chim. Fr. 2237 (1962 a)
- POISSON J. Patent
Belg. 712,841 31 Juli 1968, Appl. 27 März 1968

- PORTIER P.; M.M. JANOT :
C.R.Acad.Sci. Paris, Ser.C 276, 1727 (1973)
- PYUSKYULEV B.; I. OGNYANQY, P. PANOV : Alkaloide aus Vinca herbacea
W. K. XI. Norfluorocurarin
Tetrahedron Lett. 4559 (1967)
- RAJ K.; A. SHOEB, R. KAPIL, S.P. POPLI : Alkaloids of Tabernaemontana
divaricata
Phytochemistry 13, 1621-1622 (1974)
- RAYMOND-HAMET; D. VINCENT : Sur Quelques Effects Pharmacologiques
de Trois Alcaloides du Tabernanthe iboga Baillon, l'iboga-
mine, l'iboluteine et la Tabernanthin
Compt. Rend. Soc. Biol. 154, 2223-2227 (1960)
- REINHARD E.; A.W.ALFERMANN :Biotransformation by Plant Tissue Culture
In : A. Fischer (Herausg.) Advances in Biochemical Engineering
Plant Cell Cultures Vol. 16, 49-83 (1980)
- RENNER U. : Voacamidin und Voacristin, zwei neue Alkaloide aus
Voacanga africana Stapf.
Experientia 13, 468-469 (1957)
- RENNER U. : Vobasin und Voacryptin,zwei neue Alkaloide aus Voacanga
africana Stapf.
Experientia 15, 185 (1959)
- RENNER U.; D.A. PRIUS, A.L. BURLINGAME, K. BIEMANN : Die Struktur
der 2-Acy lindol-Alkaloide Vobasin.Dregamin und Tabernae-
montamin
Helv. Chim. Acta 46, 2186 (1983)
- REUTER G. Regeneration von Kulturpflanzen aus Gewebekulturen
Deutsch. Gartenbau 29, 1186-1192 (1981)
- RICHTER W.J.; H. SCHWARZ : Chemische Ionisation-ein stark Bedeutung
gewinnendes massenspektroskopisches Analysenverfahren
Angew. Chem. 90, 449 (1978)
- RÜFFER M.; O. EKUNDAYO, N. NAGAKURA, M.H. ZENK : Biosynthesis of
the Protoberberine Alkaloid Jatrorrhizine
Tetrahedron Lett. 24, 2643-2644 (1983)
- SAENZ J.A.;M.NASSAR : Phytochemical Screening of Cost Rican Plants
Alkaloid Analysis
Rev.Biol.Trop.Univ.Costa Rica 13,207-212 (1965)
- SCHLITTLER E.; A. FURTMEIER : Vincamin, ein Alkaloid aus Vinca Minor L.
Helv. Chim. Acta 36, 2017 (1953)
- SCHNOSS H.K.;A.L.BURLINGAME,K.BIEMANN : Application of Mass Spectro-
metry to Structure Problems IX. Occurence of Eburnamenine
and Related Alkaloids in Rhazya stricta and Aspidosperma
quebrachoblanco
Tetrahedron Lett. 993-999 (1962)

- SCHLEIDEN M.I. : Beiträge zur Phytogenese
Müllers Archiv 137 (1838)
- SCHUMANN K. : Apocynaceae In : Die Natürlichen Pflanzenfamilien
IV. A.Engler,K. Prantl (Herausg.) 109-189 (1895)
- SCHWANN T. : Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung
in der Struktur und dem Wachstum der Tiere und der Pflanzen
Berlin (1839)
- SCHOBEL H.; J. STÖCKIGT : RLCC-isolation of Raucaffricine from its most efficient
source- cell suspension cultures of Rauwolfia serpentina Benth.
Plant Cell Rep. 3, 72-74 (1984)
- SCOTT A.I.; A.A. QUERESHI : Biogenesis of Strychnos,Aspidosperma,
and Iboga Alkaloids. The Structure and Reaktion of
Preakuammicine
J.Am.Chem.Soc. 91, 5874 (1969)
- SCOTT A.I. : Biogenetic-Typ Synthesis of the Indole Alkaloids
Bioorganic Chemistry 3, 398-429 (1974)
- SCOTT A.I.; S. L. LEE : Biosynthesis of the Indole Alkaloids. A Cell
Free System for Chatharanthus roseus.
J.Am.Chem.Soc. 97, 6906-6908 (1975)
- SMITH G.F.; M.A. WALLID : The Isolation of (⁺)- and (+)- Vincadif-
formin and of (+)-1,2-Dehydroaspidospermidin from
Rhazya stricta
J.Chem.Soc. 4002 (1963)
- SMITH G.N. : Strictosidine : A Key Intermediate in the Biogenesis
of Indole Alkaloids
Chem.Comm. 912-914 (1968)
- SMITH G.N.;K.T.D.De SILVA,D.KING : 5 α -Carboxystrictosidin
Chem.Commun. 908 (1971)
- SPRECHER E. : Die Produktion von Arzneistoffen durch Mikroorganismen
Voraussetzungen, Möglichkeiten und Grenzen
In : F.C. Czyga (Herausg.) : Biogene Arzneistoffe
Vieweg Verlag,Braunschweig/Wiesbaden 117-142 (1983)
- STAUFFACHER D. : Alkaloide aus Diplorrhynchos condylocarpon (Muell.
ARG.) PICHON ssp. mossambiensis (BENTH.) DUVIGN.
Helv.Chim.Acta 44,2006 (1961)
- STÖCKIGT J.; M. H. ZENK : Enzymatic Synthesis of Chlorogenic Acid
from Caffeyol CoEnzyme A and Quinic Acid
FEBS Letters 42, 131-134 (1974)
- STÖCKIGT J.; M.H.ZENK : Strictosidine the Key Intermediate in the
Biosynthesis of Monoterpenoid Indole Alkaloids
Chem. Comm. , 646-648 (1977)
- STÖCKIGT J. : Enzymatic Formation of Intermediates in the Biosynthesis
of Ajmalicin : Strictosidine and Cathenamine
Phytochemistry 18, 965-971 (1979)
- STÖCKIGT J. : The Biosynthesis of Heteroyohimbine-Typ Alkaloids
In : Indole and Biogenetically Related Alkaloids
J.D.Phillipson,M.H.Zenk (Herausg.)
Academic Press, New York 1980 a

- STÖCKIGT J.; H.J. SOLL : Indole Alkaloids from Cell Suspension Cultures of Catharanthus roseus and C. ovalis
Planta medica 40, 22-30 (1980)
- STÖCKIGT J.; A. PFITZNER, J. FIRL : Indole Alkaloids from Cell Suspension Cultures of Rauwolfia serpentina Benth.
Plant Cell Rep. 1, 36-39 (1981)
- STÖCKIGT J.; K.-H. PAWELKA, A. ROTHER, B.DEUS : Indole Alkaloids from Cell Suspension Cultures of Stemmadenia tomentosa and Voacanga africana
Z. Naturforsch. 37c, 857-860 (1982)
- STÖCKIGT J.; K.-H. PAWELKA, T. TANAHASHI, B. DANIELI, W. HULL :
Voafrine A and Voafrine B, Neue Dimeric Indole Alkaloids from Cell Suspension Cultures of Voacanga africana Stapf.
Helv.Chim.Acta 66, 2525-2533 (1983)
- SUGA T.; T. HIRATA, T. AOKI, Y. SOOK LEE, H. HAMADA, M. FUTATSUGI :
The Biochemical Potentiality of Plant Cultured Cells to Transform Foreign Substrates. The Transformation Governed by the Type of the Funktional Group of the Substrates.
In : 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture A.Fujiwara (Herausg.) 381-382 (1982)
- TABATA M.; H. MIZUKAMI, S. NAOE, M KANOSHIMA : Antimikrobial Activity of Lithospermum erythrorhizon Callus Cultures
Yakugaku Zasshi 95, 1376-1379 (1975)
- TABATA M.; N. HIRAOKA, M. IKENOUE, Y. SANO, M. KONOSHIMA : The Production of Anthraquinones in Callus Cultures of Cassia tora
Lloydia 38, 131-134 (1975 a)
- TALAPATRA B.; A. PATRA, S.K. TALAPATRA : Terpenoids and Alkaloids of the Leaves of Tabernaemontana coronaria
Phytochemistry 14, 1652-1653 (1975)
- TAYLOR W. I. : Iboga Alkaloids. II The Structures of Ibogain, Ibogamin and Tabernanthin.
J. Am. Chem. Soc. 79, 3298-3299 (1957)
- TAYLOR W.I. : The Iboga and Voacanga Alkaloids
In : The Alkaloids Vol. 8 . Manske R.H.F. (Herausg.)
Academic Press New York, 1965
- TAYLOR W.I. : The Iboga and Voacanga Alkaloids
In : The Alkaloids Vol. 11. Manske R.H.F. (Herausg.)
Academic Press New York , 1968
- TAYLOR W.I.; N.R. FARNSWORTH (Herausg.) : The Vinca Alkaloids
Marcel Dekker, New York 1975
- TOMCZYK H. : Pharmacobotanical Studies of Amsonia angustifolia
Dissertationes Pharm. 16, 297-310 (1964)
- UESATO S.; S. UEDA, K. KOBAYASHI, H. INOUE : Biosynthesis of Iridoid Glucosides in Cultured Cells of Gardenia jarmioide F. grandiflora
In : 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. A. Fujiwara (Herausg.) Tokyo, 1982

- ULBRICH B.; M.H. ZENK : Partial Purification of Hydroxycinnamoyl-CoA: Quinate Hydroxycinnamoyl Tranferase from Higher Plants
Phytochemistry 18, 929-933 (1979)
- VAN BEEK T.A. ; A.M. DEELDER, R. VERPOORTE, A. BAERHEIM-SVENDSEN :
Antimicrobial, Antimoebic and Antiviral Screening of Some
Tabernaemontana Species
Plant. Med. 50, 180-185 (1984)
- VELIKY I.A.; R.K. LATTA : Antimicrobial Activity of Cultured Plant
Cells and Tissues
Lloydia 37, 611-620 (1974)
- VOGEL G.; H. UEBEL : Zur Pharmakologie der Alkaloide aus Voacanga
africana Stapf.
Ärznemittel Forsch. 11, 787-793 (1961)
- WALLS F.; O. COLLERA, A. SANDOLVAL : Alkaloids from Stemmadenia Species
Tetrahedron 2, 173-182 (1962)
- WALSER A.; C. DJERASSI : Alkaloid-Studien LII. Die Alkaloide aus
Vallesia dichotoma Ruiz. et Pav.
Helv. Chim. Acta 48, 391 (1965)
- WENKERT E. : Biosynthesis of Indole Alkaloids. The Aspidosperma and
Iboga Bases
J. Am. Chem. Soc. 84, 98 (1962)
- WENKERT E.; B. WICKBERG : General Methods of Synthesis of Indole
Alkaloids IV. A Synthesis of dl-Eburnamnine
J. Am. Chem. Soc. 87, 1580 (1965)
- WENKERT E.; D.W. COCHRAN, E.W. HAGAMANN, F.M. SCHELL, N. NEUSS, A.S.
KATNER, P. POTIER, C. KAN, M. PLAT, M. KOCH, MELLRI, J.
POISSON, N. KUNESCH, Y. ROLLAND : Carbon 13 Nuclear
Magnetic Resonance Spektroskopie of Naturally Occuring
Substances XIX. Aspidosperma Alkaloids
J. Am. Chem. Soc. 95, 4990 (1973)
- YAGUDAEV M.R.; V.M. MALIKOV, S.Y. YUNUSOV : Structure of Vinervinine,
Vinervine, Vincanidine and Vincamicine
Khim. Priro. Soedin. 10, 260-261 (1974)
- ZECHES M.; M.M. DEBRAY, G. LEDOUBLE, L. LE MEN-OLIVIER, J. LE MEN :
Alcaloides du Pandaca caducifolia
Phytochemistry 14, 1122 (1975)
- ZENK M.H.; H. EL SHAGI, U. SCHULTE : Anthraquinone Production by Cell
Suspension Cultures of Morinda citrifolia
Planta Med. Suppl. 79-101 (1975)
- ZENK M.H.; H. EL-SHAGI, H. ARENS, J. STÖCKIGT, E.W. WEILER, B. DEUS:
Formation of the Indole Alkaloids Serpentin and Ajmalicine
in Cell Suspension Cultures of Catharanthus roseus
In: Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application
Barz W., Zenk M.H. (Herausg.), Springer Verlag Berlin, Heidelberg,
New York 1977

- ZENK M.H. : Enzymatic Synthesis of Ajmalicine and Related Indole Alkaloids.
J.Nat.Prod. 43, 438-451 (1980)
- ZENK M.H. : Pflanzliche Zellkulturen in der Arzneimittelforschung
In : Fortschrittsberichte aus Naturwissenschaft und Medizin
Verhandlungen der Gesellschaft deutscher Naturforscher
und Ärzte 112 Versammlung, Mannheim 1982
Staab, H.A.; W.Gerek, H. Markl, W. Martienssen, H. Gibian
(Herausg.)
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 145-162
(1982)
- ZETTLER G. : Einige pharmakologische Eigenschaften von 12 natürlichen
und 11 partialsynthetisch abgewandelten Indol-Alkaloiden
aus tropischen Apocynaceen des Subtribus Tabernaemontaninae
Arz.Forsch. 14, 1277-1284 (1964)
- ZETTLER G.; E. LENDSCHOW, W. PRENGER-BERINGHOFF : The Actions of
11 Indole Alkaloids on an Guinea Pig Heart in Vivo and
in Vitro, Compared with those of 2 Synthetic Azepinoindols
Quinidine and Quindonium
Naunym-Schmiedbergers Arch. Pharmakol. Exp. Pathol.
260, 26-49 (1968)
- ZSABON B.; P. KAPCS : (+)-Vincadifformine from Amsonia tabernaemontana
Walt.
Tetrahedron Lett. 4615-4616 (1970)

DANKSAGUNG

Herrn Doz. Dr. J. Stöckigt danke ich für die Anregung zur Bearbeitung dieses Themas. Besonders seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft haben zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Herrn Prof.Dr. M.H. Zenk danke ich für die guten Arbeitsmöglichkeiten und für die Bereitstellung der Gewebekulturen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof.Dr. B. Danieli (Mailand) für die Hilfe bei der Interpretation der ^1H -NMR-Spektren, Herrn Prof. Dr. H. Wagner (München) für die Möglichkeit zur Bestimmung der optischen Drehung und Herrn Prof. Dr. H. Scheer (München) für die Erstellung der CD-Spektren.

Ebenfalls gilt mein Dank allen anderen, die mit Rat und Tat zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Dem Sonderforschungsbereich 145 der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn, sei für die finanzielle Unterstützung gedankt. Empfänger war Herr Doz. Dr. J. Stöckigt.

LEBENS LAUF

Am 6. Oktober 1954 wurde ich, Karl-Heinz Pawelka, als Sohn von Karl-Armin Pawelka und seiner Ehefrau Margarete, geb. Laßwitz, in Koblenz geboren.

Im Jahre 1961 wurde ich in die Volksschule in Rosenheim eingeschult und legte 1975 am Christian-Ernst-Gymnasium in Erlangen mein Abitur ab.

Im Sommersemester 1976 nahm ich das Studium der Pharmazie an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen auf, das ich im November 1980 abschloß.

Im November 1981 legte ich die Approbationsprüfung ab und erhielt im Januar 1982 die Approbation.

Im Mai 1981 begann ich unter der Leitung von Herrn Doz. Dr. Stöckigt mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Seit Mai 1981 habe ich eine Stelle als teilzeitbeschäftigte wissenschaftliche Hilfskraft inne.

